

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka

Untersuchung erkrankungsmodifizierender und antiepileptogener
Effekte eines PPAR γ -Agonisten in chronischen
Epilepsiemodellen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Katharina Sophie Boes

aus Pforzheim

München 2014

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Uni.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Korreferent: Prof. Dr. Andrea Fischer

Tag der Promotion: 12. Juli 2014

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Epilepsie	2
1.1.	Definition und Bedeutung	2
1.2.	Klassifizierung	2
1.3.	Bedeutung psychiatrischer Komorbiditäten und kognitiver Defizite bei Epilepsieerkrankungen	5
1.4.	Therapie.....	7
1.5.	Tiermodelle	8
2.	Mikroglia.....	11
2.1.	Einführung.....	11
2.2.	Herkunft der Mikroglia	11
2.3.	Funktion der Mikroglia	11
2.4.	Bedeutung in der Epileptogenese	13
3.	Anfallsinduzierte neuronale Plastizität	14
3.1.	Einführung.....	14
3.2.	Hippocampale Neurodegeneration	15
3.3.	Neurogenese	16
3.4.	Neuronale Plastizität und Mikroglia	17
4.	Prüfung der Wirksamkeit des PPARγ-Agonisten Rosiglitazon.....	17
4.1.	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma (PPAR γ).....	17
4.2.	PPAR γ -Agonisten	20
4.3.	Rosiglitazon.....	21
5.	Verhaltensuntersuchungen.....	23
5.1.	Einführung.....	23
5.2.	Verhaltensmodelle.....	23
5.2.1.	Open Field	23
5.2.2.	Black White Box	24
5.2.3.	Elevated Plus Maze	25
5.2.4.	Morris Water Maze	25
III.	ZIELSETZUNG UND ARBEITSHYPOTHESEN	27

IV.	MATERIAL UND METHODEN	29
1.	Prüfung des PPARγ-Agonisten Rosiglitazon im Post-Status-Epilepticus-Modell der Temporallappenepilepsie	29
1.1.	Versuchstiere	29
1.2.	Post-Status-Epilepticus-Modell.....	29
1.2.1.	Implantation der Elektrode.....	29
1.2.2.	BLA-Dauerstimulation.....	31
1.2.3.	Anfallsparameter	32
1.3.	PPAR γ -Agonist Rosiglitazon.....	33
1.4.	Bestimmung des Blutglukosespiegels.....	34
1.5.	Erfassung spontaner epileptischer Anfälle.....	34
1.5.1.	EEG-Aufzeichnungen	34
1.5.2.	Video-Aufzeichnungen	35
1.6.	Verhaltensuntersuchungen	35
1.6.1.	Open Field	36
1.6.2.	Black White Box	36
1.6.3.	Elevated Plus Maze	37
1.6.4.	Morris Water Maze	38
1.7.	Histologische Gewebeaufbereitung.....	39
1.7.1.	Transkardiale Perfusion.....	39
1.7.2.	Herstellung der Gefrierschnitte	39
1.8.	Immunhistochemische und histologische Färbemethoden.....	40
1.8.1.	Nissl-Färbung.....	41
1.8.2.	Interleukin-1 beta	42
1.8.3.	BrdU/NeuN	42
1.8.4.	ED1.....	43
1.9.	Auswertung und Statistik	44
1.10.	Versuchsdesign.....	46
2.	Prüfung des PPARγ-Agonisten Rosiglitazon im Amygdala-Kindling-Modell der Temporallappenepilepsie	48
2.1.	Versuchstiere	48
2.2.	Amygdala-Kindling-Modell.....	49
2.2.1.	Implantation der Elektrode.....	49
2.2.2.	Kindling.....	49

2.2.3.	Substanzversuch	51
2.2.4.	Massive Kindling	51
2.3.	Transkardiale Perfusion und Herzblutentnahme	52
2.4.	Statistik.....	52
2.5.	Versuchsdesign.....	53
V.	ERGEBNISSE	55
1.	Prüfung des PPARγ-Agonisten Rosiglitazon im Post-Status-Epilepticus-Modell der Temporallappenepilepsie	55
1.1.	Elektrisches SE-Modell.....	55
1.2.	Beeinflussung des Blutglukosespiegels	56
1.3.	Erfassung spontaner epileptischer Anfälle.....	57
1.4.	Verhaltensuntersuchungen	57
1.4.1.	Open Field	57
1.4.2.	Black White Box	57
1.4.3.	Elevated Plus Maze	58
1.4.4.	Morris Water Maze	58
1.5.	Immunhistochemische Analysen.....	62
1.5.1.	Nissl-Färbung	62
1.5.2.	Interleukin-1 beta	65
1.5.3.	BrdU/NeuN	65
1.5.4.	ED1.....	66
2.	Prüfung des PPARγ-Agonisten Rosiglitazon im Amygdala-Kindling-Modell der Temporallappenepilepsie	67
2.1.	Wirksamkeit verschiedener Dosierungen von Rosiglitazon	67
2.2.	Effekt von Rosiglitazon auf die Wirksamkeit des Standardantiepileptikums Phenobarbital.....	68
VI.	DISKUSSION	71
1.	Post-Status-Epilepticus-Modell.....	72
2.	Amygdala-Kindling-Modell	78
3.	Schlussfolgerung.....	80
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	81
VIII.	SUMMARY.....	84

IX.	LITERATURVERZEICHNIS	86
X.	ANHANG	146
1.	Abbruchkriterien nach dem Irwin-Score-System	146
2.	Lösungen	150
3.	Protokolle der Färbungen	154
4.	Substanzen	158
5.	Geräte	162
XI.	DANKSAGUNG	165

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ADD	After discharge duration
ADT	After discharge threshold
AED	Antiepileptic drug, Antiepileptikum
ap	anterior posterior
Aqua dest.	Aqua destillata
Aqua ad inj.	Aqua ad injectabilia
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BrdU	Bromdesoxyuridin
BWB	Black White Box
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CA	Cornu ammonis, Ammonshorn
CD68	Cluster of differentiation 68
cm	Zentimeter
Cy	Carbocyanin
CYP	Cytochrom
DAB	Diaminobenzidin
DBD	DNA-bindende Domäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dv	dorsoventral
EEG	Elektroenzephalogramm
ED 1	Extracellular domain 1
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPM	Elevated Plus Maze
g	Gramm
GD	Gyrus dentatus
GST	Generalized seizure threshold
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Horseradish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
Hz	Hertz
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
ILAE	International League against Epilepsy
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase

i.p.	intraperitoneal
kg	Kilogramm
lat	laterolateral
LBD	Liganden-bindende Domäne
LPS	Lipopolysaccharid
LSAB	Labelled Streptavidin Biotin
M	molare Masse
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ms	Millisekunde
MWM	Morris Water Maze
μ A	Mikroampere
μ m	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NeuN	Neural specific nuclear protein (neuronales Kernprotein)
NMDA	N-Methyl-Aspartat
NSAID	Nichtsteroidales Antiphlogistikum
OF	Open Field
PPAR γ	Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma
PPRE	PPAR response elements
s	Sekunde
s.c.	subkutan
SD	Seizure duration
SE	Status epilepticus
SEM	Standardfehler
SS	Seizure severity
SSC	Saline-Natriumcitrat
SSSE	Sich selbst-erhaltender Status epilepticus
SGZ	Subgranuläre Zone des Gyrus dentatus
SVZ	Subventrikuläre Zone des anteriolateralen Seitenventrikels
Tab.	Tabelle
TLE	Temporallappenepilepsie
TLR	Toll-like-Rezeptor
TBS	Tris buffered saline

ZNS	Zentrales Nervensystem
-----	------------------------

I. EINLEITUNG

Epilepsien stellen eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen bei Tier und Mensch dar (KNOWLES 1998; CHANG u. LOWENSTEIN 2003). Nicht nur die wiederholt auftretenden Krampfanfälle erschweren das Leben der Patienten maßgeblich, sondern auch die damit verbundenen psychiatrischen Komorbiditäten und kognitiven Defizite (FISHER et al. 2005). Die Behandlung von Epilepsien erfordert meist eine lebenslange Therapie mit antiepileptischen Medikamenten. Dabei wird bei ungefähr einem Drittel aller Erkrankten eine therapieresistente Form der Epilepsie diagnostiziert (HITIRIS et al. 2007). Die Erforschung neuer Strategien zur Behandlung von Epilepsien ist daher unverzichtbar. Ein neuer Ansatz zur Prävention der Epilepsieerkrankungen besteht darin, die Entstehung der Epilepsie (Epileptogenese) bei Risikopatienten zu verhindern (PITKANEN et al. 2007). Es konnte bereits belegt werden, dass entzündliche Vorgänge durch die Aktivierung mikroglialer Zellen maßgeblich an der Epileptogenese beteiligt sind (ZIMMER et al. 1997; PLATA-SALAMAN et al. 2000; RAVIZZA et al. 2005). Ein interessanter Ansatzpunkt aktueller Studien stellt der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor gamma (PPAR γ) dar (LANDRETH et al. 2008; CARTA u. PISANU 2013). Dieser Rezeptor wird unter anderem auch in mikroglialen Zellen exprimiert. Seine Aktivierung unterdrückt die Expression proinflammatorischer Zytokine und vermittelt dadurch eine entzündungshemmende Wirkung (JONES et al. 2002; MORAES et al. 2006). Eine antiinflammatorische Wirkung des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon wurde bereits in mehreren Studien neurologischer Erkrankungen nachgewiesen (KIAEI et al. 2005; LANDRETH et al. 2008; CARTA u. PISANU 2013). Des Weiteren konnten bereits antiinflammatorische sowie neuroprotektive Effekte von Rosiglitazon in Studien chemisch induzierter Epilepsiemodelle festgestellt werden (YU et al. 2008; CHUANG et al. 2012; HONG et al. 2012; HONG et al. 2013). Im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens soll die Wirkung von Rosiglitazon auf die Epileptogenese untersucht werden. Zudem sollte die Wirksamkeit von Rosiglitazon in einer nicht antikonvulsiven Dosierung auf ein subtherapeutisch dosiertes Standardantiepileptikum evaluiert werden. Die Untersuchungen erfolgen dabei mit Hilfe zweier elektrisch-induzierter Epilepsiemodelle.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Epilepsie

1.1. Definition und Bedeutung

Epilepsien zählen zu den am meisten verbreiteten neurologischen Erkrankungen in der Veterinärmedizin. Neben Katzen erkranken vor allem Hunde an Epilepsie (PODELL et al. 1995; KNOWLES 1998). Beim Araberfohlen wurde die juvenile Epilepsie mit genetischer Ätiologie beschrieben (ALEMAN et al. 2006). Auch in der Humanmedizin gehören Epilepsieerkrankungen zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen. Weltweit sind etwa 70 Millionen Menschen betroffen. Dies entspricht einer Prävalenz von 1-2% (BROWNE u. HOLMES 2001; NGUGI et al. 2010). Die betroffenen Patienten weisen eine hohe Mortalität auf. Zudem führen Epilepsieerkrankungen in der Humanmedizin häufig zu Berufsunfähigkeit (CHANG u. LOWENSTEIN 2003; DIOP et al. 2003). Epilepsien werden als Störung des Gehirns definiert. Diese ist durch eine andauernde Prädisposition gekennzeichnet epileptische Anfälle zu entwickeln. Zudem stehen Epilepsieerkrankungen in Verbindung mit neurobiologischen, kognitiven, psychologischen und sozialen Konsequenzen (FISHER et al. 2005). Ein epileptischer Anfall entsteht durch abnormale exzessive oder synchrone neuronale Entladungen des Gehirns (FISHER et al. 2005). Das epileptische Gehirn ist durch eine Vielzahl von Veränderungen geprägt. Von diesen Alternationen sind beispielsweise Ionenkanäle, Synapsen, Gliazellen oder inflammatorische Vorgänge betroffen (JACOBS et al. 2009). Bislang ist es nicht gelungen, die zellulären und molekularen Mechanismen, welche zur Epilepsieentstehung beitragen, vollständig aufzuklären.

1.2. Klassifizierung

Für eine erfolgreiche Therapie der Epilepsieerkrankungen ist die Klassifizierung der Epilepsie unumgänglich (BROWNE u. HOLMES 2001). Die Internationale Liga gegen Epilepsie (*International League against Epilepsy*, ILAE) gibt das Konzept zur Einteilung der Epilepsien vor. Im Jahr 2010 wurde von der ILAE ein Leitfaden für eine revidierte Klassifizierung veröffentlicht (BERG et al. 2010). Derzeit werden die exakte Definition der Epilepsieerkrankungen und die daraus

resultierende Eingruppierung allerdings noch einmal von der ILAE überarbeitet. Nachfolgend wird die Klassifizierung der ILAE gemäß der Veröffentlichung von 2010 beschrieben.

Im Hinblick auf das Anfallsmuster werden fokale, generalisierte und unklassifizierbare Anfälle unterschieden (BERG et al. 2010). Fokale Anfälle haben ihren Ursprung in einer umschriebenen Gehirnregion. Diese Region kann sich weiter ausweiten. Dabei entwickelt sich ein bilaterales konvulsives Anfallsgeschehen, der Anfall generalisiert sekundär und geht somit mit einem eingeschränkten Bewusstsein einher. Ein einfacher fokaler Anfall dagegen weist keine Bewusstseins Einschränkungen auf (FISHER et al. 2005). Ein generalisierter Anfall tritt in einem bilateral verteilten Netzwerk auf und breitet sich dort sehr schnell aus (BERG et al. 2010). Von einem *Status epilepticus* (SE) wird gesprochen, wenn die Anfallsaktivität länger als fünf Minuten andauert oder mindestens zwei Anfälle aufeinander folgen. Dabei erfolgt keine vollständige Erholung des Bewusstseins (LOWENSTEIN et al. 1999; FISHER et al. 2005). Im Hinblick auf generalisierte Anfälle werden myoklonische (unwillkürliche Muskelzuckungen), klonische (Ruderkrämpfe), tonische (Streckkrämpfe), tonisch-klonische, atonische (erschlassende Muskulatur) Anfälle und Absencen (Bewusstseinsminderung mit nachfolgender Amnesie) differenziert (BERG et al. 2010). Es existiert keine weitergehende Klassifizierung für fokale Anfälle.

Epilepsieerkrankungen können auch anhand der Ätiologie kategorisiert werden. Hierbei wird zwischen genetischen, strukturellen/metabolischen sowie unbekannten Ursachen unterschieden. Bei einem Drittel aller Epilepsien ist die Ursache unbekannt. Zu unbekannten Epilepsien zählen beispielsweise epileptische Spasmen (BERG et al. 2010). Bei Epilepsieerkrankungen mit struktureller bzw. metabolischer Ursache liegt eine separate Erkrankung vor, welche in keinem direkten Zusammenhang mit der Epilepsie steht. Strukturelle Ursachen beinhalten erworbene Erkrankungen wie Schlaganfälle, Traumen und Infektionen (BERG et al. 2010). Häufig sind unter anderem Gehirntumore, zerebrovaskuläre Krankheiten, perinatale Insulte, Fieberkrämpfe und SE Auslöser der Epilepsieerkrankungen (ANNEGERS et al. 1996). Zwischen den epilepsieauslösenden Insulten und der ersten Symptomatik liegt eine variable Latenzzeit. Diese Zeitspanne wird als Epileptogenese bezeichnet und kann beim Menschen nach einem Unfall bis zu mehreren Jahren andauern (PITKANEN et al.

2007; KHARATISHVILI u. PITKANEN 2010).

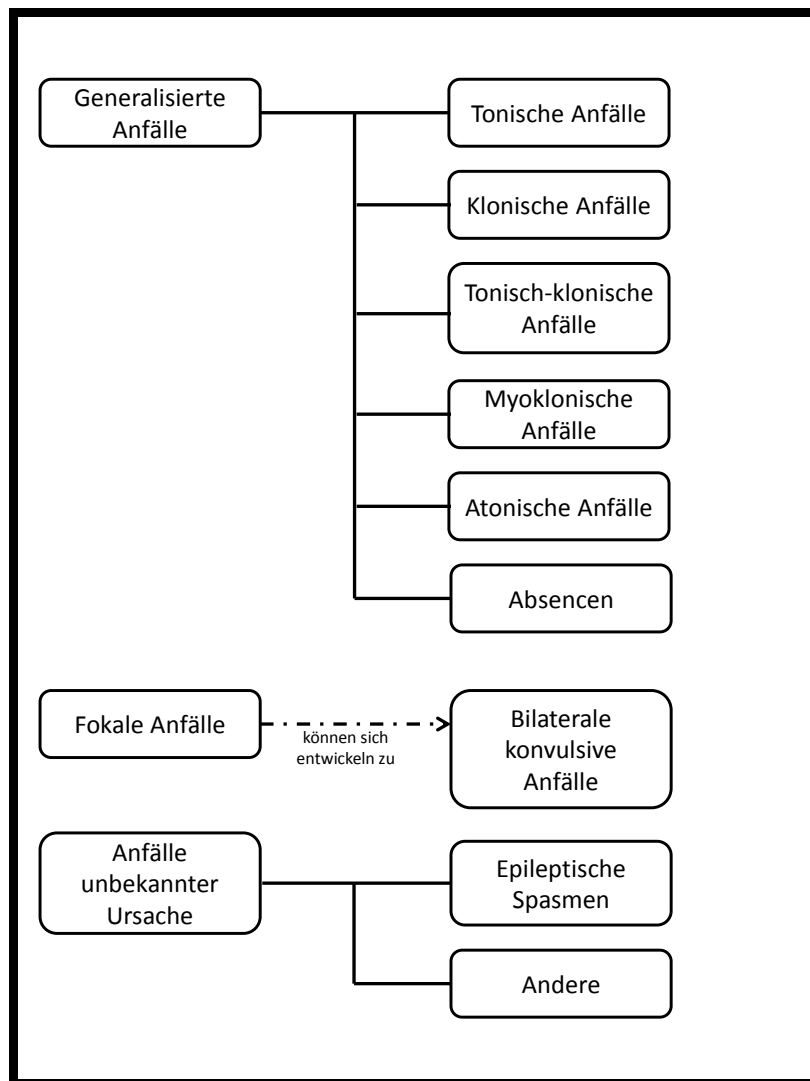


Abb. 1 Klassifizierung epileptischer Anfälle anhand der Anfallsmuster nach BERG et al. (2010)

Temporallappenepilepsie

Fokale Epilepsien werden abhängig von der betroffenen Gehirnregion in Temporal-, Frontal-, Parietal- und Okzipitallappenepilepsie unterteilt (DREIFUSS 1994). Die beim Erwachsenen am Weitesten verbreitete Form stellt die Temporallappenepilepsie (TLE) dar (HAUSER et al. 1993; ENGEL 2001). Diese Epilepsieform ist charakterisiert durch die fortschreitende Entwicklung spontaner Anfälle, deren Ursprung sich im Temporallappen befindet (ENGEL 1996). Dort entwickeln sich diese Anfälle im Hippocampus, der Amygdala und den umgebenden kortikalen Arealen (TUUNANEN et al. 1997). Charakteristischerweise treten bei der TLE insbesondere einfache oder komplexe

fokale Anfälle auf, die sekundär generalisieren können (CHANG u. LOWENSTEIN 2003). Vor allem bei Erwachsenen, die an TLE erkrankt sind, stellt die hippocampale Sklerose eine der häufigsten histopathologischen Befunde dar (CAVANAGH u. MEYER 1956; BLUMCKE et al. 2002; BLUMCKE et al. 2012). Insbesondere die Regionen des Ammonshorn (*Cornu ammonis*, CA) im Hippocampus sowie der Hilus des *Gyrus dentatus* (GD) sind davon betroffen, wobei Neuronenverluste von typischerweise über 50 Prozent auftreten (ENGEL 1996; FISHER et al. 1998). Es besteht bisher noch keine Gewissheit darüber, ob die hippocampale Sklerose eine Ursache oder eine Konsequenz der TLE darstellt (FISHER et al. 1998; JEFFERYS 1999; MASUKAWA et al. 1999). Auch andere Bereiche wie der Thalamus, die Amygdala sowie entorhinale, perirhinale und parahippocampale Bereiche können eine massive Neurodegeneration aufweisen (PITKANEN et al. 1998; YILMAZER-HANKE et al. 2000; JUTILA et al. 2002).

1.3. Bedeutung psychiatrischer Komorbiditäten und kognitiver Defizite bei Epilepsieerkrankungen

In der Veterinärmedizin konnten bereits beim Hund epilepsieassoziierte Verhaltensänderungen nachgewiesen (SHIHAB et al. 2011). Beim Menschen stehen kognitive Defizite wie Wahrnehmungsstörungen, Aufmerksamkeitsstörungen, Gedächtnisprobleme oder auch Sprachstörungen häufig im Zusammenhang mit epileptischen Anfällen (FISHER et al. 2005). Zudem kommen oft epilepsieassoziierte Verhaltensstörungen vor. Diese Störungen bzw. Defizite können sich mit der Zeit verschlimmern und potenziell in Verbindung mit jeder Epilepsieform auftreten (BERG et al. 2010). Ursache der kognitiven Störungen ist häufig der neuronale Zelltod, welcher durch die Anfälle verursacht wird. Der neuronale Zellverlust steht dabei proportional im Verhältnis zu den kognitiven Defiziten (KOTLOSKI et al. 2002). Des Weiteren leiden vor allem TLE-Patienten häufig an psychosozialen Störungen wie Depression, sozialer Angst, Isolationsgefühlen und Beziehungsproblemen (MOORE u. BAKER 2002; OYEGBILE et al. 2004). Epidemiologische Studien konnten nachweisen, dass Depression eine häufige Begleiterkrankung der Epilepsie darstellt (O'DONOGHUE et al. 1999; TELLEZ-ZENTENO et al. 2007). Zudem weisen Menschen, die an Depressionen erkrankt sind, ein höheres Risiko auf, epileptische Anfälle zu entwickeln (FORSGREN u. NYSTROM 1990; HESDORFFER et al. 2006; HESDORFFER et al. 2007). Auch bei

Epilepsiemodellen an Nagetieren wurde festgestellt, dass Verhaltensveränderungen wie Angstverhalten oder Depressionen mit der Epilepsie assoziiert sind (MAZARATI et al. 2007; MAZARATI et al. 2008; MAZARATI et al. 2009). Durch die epilepsieassoziierten psychiatrischen Komorbiditäten sowie die kognitiven Defizite wird die Lebensqualität der Patienten zusätzlich massiv beeinträchtigt (LEHRNER et al. 1999; JOHNSON et al. 2004). In der Humanmedizin sind Epilepsiepatienten zudem von einem erhöhten Risiko betroffen, Suizid zu begehen (HECIMOVIC et al. 2011). Im Zusammenhang mit Epilepsieerkrankungen wird zudem oft von kognitiven Defiziten, insbesondere mentaler Schwäche, Gedächtnisverlust sowie Aufmerksamkeitsdefiziten berichtet (VAN RIJCKEVORSEL 2006). Vor allem bei TLE-Patienten stellen Lern- und Gedächtnisprobleme eine häufige Begleiterscheinung dar (BERGIN et al. 2000). Verschiedene Faktoren wie zum Beispiel das Alter, in dem der erste Anfall aufgetreten ist (LESPINET et al. 2002), die Krampfschwere, die Frequenz der Anfälle, der Anfallstyp (PULLIAINEN et al. 2000; HENKIN et al. 2005) sowie das Therapiemanagement beeinflussen diese kognitiven Schwächen maßgeblich (LORING u. MEADOR 2001). Angststörungen, die in Verbindung mit Epilepsieerkrankungen auftreten, wurden im Vergleich zu epilepsieassoziierten Depressionen weitaus weniger erforscht, obwohl die Prävalenz diesbezüglich vergleichbar ist (CURRIE et al. 1971; HAMID et al. 2011; MULA 2013). Bei einem fokalem Anfallsmuster besteht ein höheres Risiko an Angststörungen zu leiden als bei generalisierten Anfällen (HERMANN et al. 1982; SMITH et al. 1991). Veränderungen des Gleichgewichts von Neurotransmittern wie beispielsweise Norepinephrin, Dopamin und Serotonin sowie von neuroendokrinen Substanzen wie γ -Aminobuttersäure (GABA), adrenocorticotrophe Hormone und Neuropeptid Y spielen eine besondere Rolle in der Pathogenese von epilepsieassoziierten Angststörungen (DEPAULIS et al. 1997). Aber auch psychosoziale Faktoren können das Angstverhalten von Epilepsiepatienten maßgeblich beeinflussen. Insbesondere die epilepsiebedingten Einschränkungen im alltäglichen Leben können zu einem niedrigen Selbstwertgefühl, Stigmatisierung und sozialer Ablehnung führen. Dies kann die Entstehung von Angststörungen begünstigen (MATTSON 1991).

1.4. Therapie

In der Veterinärmedizin wird derzeit als Mittel der Wahl zur Langzeittherapie der Epilepsieerkrankungen bei Hunden und Katzen Phenobarbital und Imepitoin verwendet. Sollte Phenobarbital keine effektive Wirkung zeigen, kann zusätzlich Kaliumbromid verabreicht werden (KNOWLES 1998; LÖSCHER 2003; LÖSCHER et al. 2004; POTSCHKA et al. 2009). Zur Behandlung des SE wird Diazepam verwendet. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit sowie dem Potential der hepatischen Enzyminduktion ist Diazepam für eine langfristige Therapie ungeeignet (PODELL 1998). Falls mit Hilfe dieser antiepileptischen Medikamente (*antiepileptic drugs*, AEDs) die Epilepsieerkrankung nicht therapierbar ist, können bei Kleintieren zusätzlich z.B. Felbamat, Zonisamid, Gabapentin oder Levetiracetam verabreicht werden (POTSCHKA et al. 2009). Sowohl in der Veterinär- als auch der Humanmedizin stellt die Pharmakoresistenz bei Epilepsien ein erhebliches Problem dar. Ungefähr ein Drittel der Epilepsiepatienten sind davon betroffen (SCHWARTZ-PORSCHKE u. JURGENS 1991; HITIRIS et al. 2007). Während manche Patienten schon zu Beginn der ersten Therapieversuche Pharmakoresistenz aufweisen, können andere diese erst mit der Zeit entwickeln (SCHMIDT u. LOSCHER 2005). Von pharmakoresistenten Epilepsien spricht man, wenn zwei angewendete Therapiepläne mit AEDs nicht zur Anfallsfreiheit führen (KWAN u. BRODIE 2006). Die AEDs können dabei entweder als Monotherapie oder in Kombination verabreicht werden (KWAN u. BRODIE 2006; MOHANRAJ u. BRODIE 2006). Die genaue Pathogenese der Pharmakoresistenz ist bislang noch unklar. Neben den Veränderungen von Zielstrukturen der AEDs wird zudem eine Überexpression von Effluxtransportern an der Blut-Hirn-Schranke diskutiert (LÖSCHER u. POTSCHKA 2002; REMY et al. 2003; POTSCHKA 2010). Bei Vorliegen einer pharmakoresistenten Epilepsieform stellt die chirurgische Resektion entsprechender Gehirnareale eine weitere Möglichkeit zur Anfallskontrolle dar (GILLIAM u. ALBERTSON 2011). In der Veterinärmedizin findet die Epilepsiechirurgie bisher jedoch keine Anwendung. Als neuer Therapieansatz für Risikopatienten werden derzeit erkrankungsmodifizierende Strategien diskutiert, wobei insbesondere antiinflammatorische Mechanismen im Vordergrund stehen (RAVIZZA et al. 2011; VEZZANI et al. 2013). Weiterführend könnten dadurch epilepsieassoziierte Komorbiditäten verhindert

oder abgemildert werden (LÖSCHER u. BRANDT 2010).

1.5. Tiermodelle

Für die experimentelle Epilepsieforschung und präklinische Entwicklung neuer pharmakologischer Strategien und Therapien sind Tiermodelle unerlässlich (LÖSCHER 2011). Generell unterscheidet man zwischen akuten und chronischen Epilepsiemodellen. Zu den akuten Modellen, sogenannten Anfallsmodellen, werden beispielsweise der Maximale-Elektroschock-Test sowie der Pentylentetrazoltest gezählt. Diese wurden vor allem zur Untersuchung neuer potentieller antiepileptischer Medikamente verwendet (BIALER u. WHITE 2010). Zur Untersuchung der Epilepsieentstehung sowie deren Beeinflussung dienen chronische Tiermodelle (LÖSCHER 2011). Zur Untersuchung der Epileptogenese wurden verschiedene Tiermodelle symptomatischer (struktureller/metabolischer) Epilepsien entwickelt. Dazu gehören neben dem *Kindling*-Modell und dem *Post-Status-Epilepticus*-Modell der Temporallappenepilepsie (TLE), auch Schädel-Hirn-Trauma- und Schlaganfall-Modelle sowie Fieberkrampf-Modelle (WALKER et al. 2002; STABLES et al. 2003; PITKANEN et al. 2007). Des Weiteren gibt es auch chronische Tiermodelle genetischer Epilepsie. Dieser genetische Hintergrund kann bei transgenen oder *knock-out* Tieren induziert oder durch spontane Mutationen hervorgerufen werden (LÖSCHER 2002).

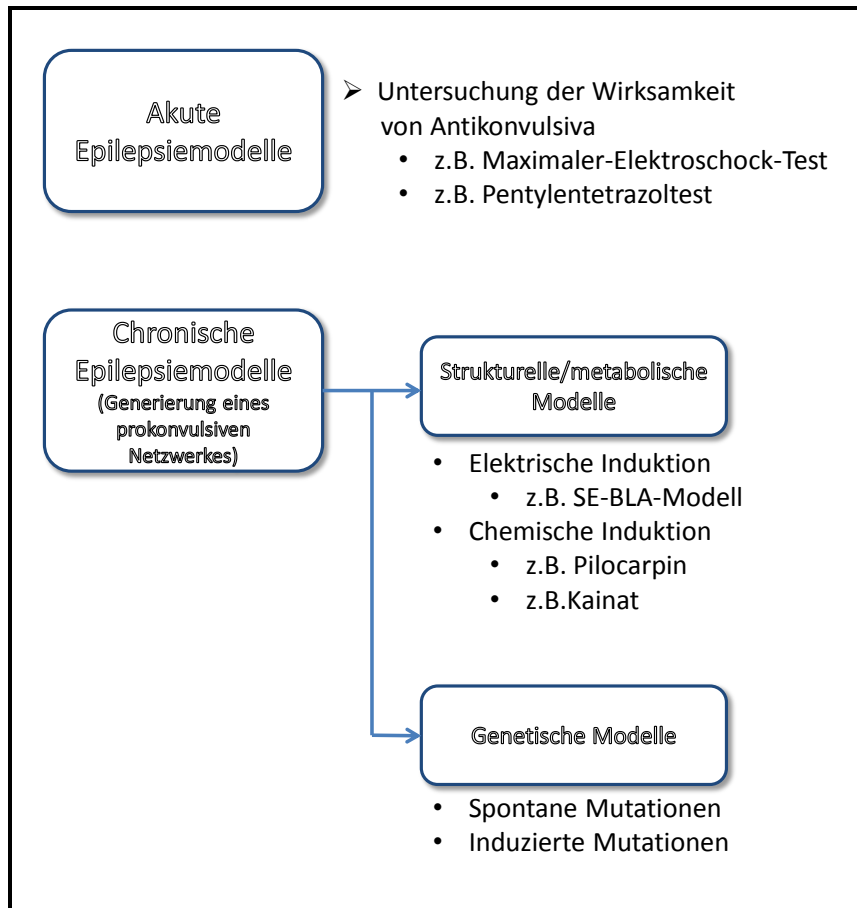


Abb. 2 Übersicht über die verschiedenen Epilepsiemodelle nach LÖSCHER (2002)

Da in diesem Dissertationsvorhaben das *Post-SE-Modell* und das *Amygdala-Kindling-Modell* angewendet wurden, sollen diese im Folgenden genauer erläutert werden.

Post-SE-Modell

Bei diesem chronischen Epilepsiemodell wird ein sich selbst-erhaltender *Status epilepticus* (SSSE) entweder durch chemische Konvulsiva (Kainat oder Pilocarpin) (HONCHAR et al. 1983; BEN-ARI 1985) oder durch elektrische Stimulation des Hippocampus oder der Amygdala hervorgerufen. Mit Hilfe dieses Tiermodells kann man entweder die Wirksamkeit von Substanzen zur Beendigung eines SE testen oder eine chronische Epilepsie mit wiederkehrenden spontanen Anfällen auslösen (LÖSCHER 2002). Im Rahmen des vorliegenden Projektes wurde die basolaterale Amygdala elektrisch stimuliert und somit das SE-BLA-Modell generiert.

Ein SE ist durch eine andauernde Anfallsaktivität mit anhaltenden oder sich

wiederholenden Anfällen charakterisiert (FISHER et al. 2005). Bei dem *Post-SE*-Modell wird den Versuchstieren eine Elektrode in den basolateralen Kern der Amygdala implantiert. Durch eine elektrische Stimulation wird dann ein SSSE induziert. Dabei sind drei verschiedene Arten von SSSE zu beobachten: 1.) anhaltende fokale Anfallsaktivität, 2.) fokale Anfälle, die wiederholt von einzelnen generalisierten Anfällen unterbrochen werden, 3.) anhaltende generalisierte Anfallsaktivität (BRANDT et al. 2003). Durch die Applikation von Diazepam wird der SSSE frühzeitig beendet. Ob die Tiere nachfolgend spontane Anfälle entwickeln, hängt vom Typ des SSSE ab. Untersuchungen haben gezeigt, dass drei Wochen im Anschluss an einen generalisierten SSSE mit einer Dauer von vier Stunden über 90 % der Ratten spontane Anfälle aufweisen (BRANDT et al. 2003).

Amygdala-Kindling-Modell

Bei diesem Tiermodell werden durch eine wiederholte kurze elektrische Stimulation limbischer Gehirnregionen wie der Amygdala oder dem Hippocampus Anfälle ausgelöst. Dieses Tiermodell wird typischerweise als TLE-Modell genutzt. Die Tiere entwickeln dabei, wie auch bei der TLE üblich, fokale Anfälle, die sekundär generalisieren (LÖSCHER 2002). Dadurch verlängert sich im Verlauf des *Kindling*-Prozesses sowohl die elektrographische als auch die zu beobachtende Krampfaktivität zunehmend. Beim *Kindling*-Modell führt die wiederholte elektrische Stimulation des Gehirns zu einer durchgehenden Abnahme der Krampfschwelle sowie der Entwicklung generalisierter Anfälle mit zunehmender Anfallsdauer (GODDARD et al. 1969). Falls die Stimulationen über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden, können bei den gekindelten Tieren spontane Anfälle auftreten (SAYIN et al. 2003). Um das *Kindling*-Modell zu generieren wird eine bipolare Elektrode stereotaktisch in den *Tractus perforans*, die Amygdala oder den *Bulbus olfactorius* implantiert (CAVAZOS et al. 2004). Nach einer Rekonvaleszenzzeit beginnt das *Kindling*. Sobald die Tiere fünf generalisierte Anfälle gezeigt haben, gelten sie als vollgekindelt und können für Substanzversuche verwendet werden (GILBERT et al. 1984).

2. Mikroglia

2.1. Einführung

Mikrogliazellen zählen zu den Zellen der Neuroglia. Diese werden auch Mesoglia- oder Hortega-Zellen genannt. Unter Neuroglia versteht man das Bindegewebe des Nervensystems, welches als Stützgerüst oder auch isolierende Hülle der Nervenfasern dient. Die Neuroglia erfüllt zudem wichtige Aufgaben bei pathologischen Veränderungen im Nervengewebe. Dazu zählen beispielsweise Phagozytose, Regeneration und Narbenbildung (SINOWATZ u. HEES 2006).

2.2. Herkunft der Mikroglia

Frühere Studien konnten bereits nachweisen, dass die Mikrogliazellen von Vorläuferzellen mit mesodermaler oder mesenchymaler Herkunft abstammen und aus der Peripherie in das Gehirn einwandern (CHAN et al. 2007). Bei Nagern wurde festgestellt, dass diese Zellen ihren Ursprung im Knochenmark haben und über den Blutkreislauf als Monozyten an Tag 10 *post natum* in das Gehirn einwandern (BROCKHAUS et al. 1993; HAAS et al. 1996). Frühere Studien zeigten, dass auch beim adulten Menschen ein Austausch an Mikroglia durch einwandernde Monozyten stattfindet (HICKEY 1991). Mittlerweile konnte jedoch belegt werden, dass dieser Austausch beim gesunden Gehirn vernachlässigbar ist (AJAMI et al. 2007; MILDNER et al. 2007). In einem gesunden intakten Gehirn existiert somit eine feste Population an Mikrogliazellen (MILDNER et al. 2007). Kommt es jedoch zu einer Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke, gelangt ein Teil der im Blut vorhandenen Monozyten in das Gehirn. Dort transformieren sich diese Zellen zu Mikrogliazellen (CHAN et al. 2007).

2.3. Funktion der Mikroglia

Die Mikroglia dient hauptsächlich der Phagozytose von Zelltrümmern. Des Weiteren können diese Zellen Lipide, Eisen und Pigmente speichern (SINOWATZ u. HEES 2006). Sie bilden somit im Gehirn die größte Population an Makrophagen. Die „ruhende“ Mikroglia ist in der Lage kleinste Veränderungen des umgebenden Gewebes wahrzunehmen und daraufhin schnell zu reagieren, wodurch sie „aktiviert“ wird. Diese Aktivierung geht mit einer morphologischen Veränderung einher. Die Mikroglia besitzt in ihrem ruhenden Zustand eine verzweigte Form mit einem kleinen Zellkörper und feinen

Zellfortsätzen. Infolge der Aktivierung ändert sich ihre Morphologie und sie erhält eine amöboide Form (KETTENMANN et al. 2011). Beeinträchtigungen oder Verlust der Homöostase des Gehirns infolge von Infektionen, Trauma, Ischämie, neurodegenerativen Erkrankungen oder veränderter neuronaler Aktivität können die Aktivierung der Mikroglia bewirken. Diese führt nicht nur zu Veränderungen der Morphologie sowie der Genexpression sondern auch zu funktionellen Veränderungen (STREIT et al. 2005; BLOCK et al. 2007; COLTON u. WILCOCK 2010; GRAEBER u. STREIT 2010). Hinsichtlich der aktivierten Mikrogliazellen lassen sich zwei unterschiedliche phänotypische Formen differenzieren: die klassische und die alternative Aktivierungs-/Deaktivierungsform (GORDON 2003; MOSSER 2003; MICHELUCCI et al. 2009). Diese zwei phänotypischen Funktionsformen stellen eine Vereinfachung dar, da auch Zwischenformen vorkommen (LYNCH 2009). Bei der klassischen Aktivierung dient die Mikroglia nach Kontakt mit fremdem Antigen als primäre Verteidigung, indem sie systemische Immunzellen rekrutiert. Die alternative Aktivierungsform wirkt neuroprotektiv. Hierbei findet keine klassische Immunantwort statt. Proinflammatorische Mediatoren werden reduziert und antiinflammatorische Zytokine sowie neurotrophe und zytoaktive Faktoren werden vermehrt produziert und freigesetzt. Diese dienen der Reparatur der extrazellulären Matrix des Gehirns (EKDAHL 2012). Die „aktivierte“ Mikroglia kann demnach verschiedenste Moleküle wie freie Radikale, inflammatorische Zytokine, Chemokine, Lipid-Mediatoren oder auch neurotrophe Faktoren synthetisieren (KREUTZBERG 1996) und somit sowohl neurodegenerativ als auch neuroregenerativ fungieren. Welche Funktion sie entwickeln, hängt von mehreren Faktoren wie beispielsweise der Art der Belastung, dem Signal der Zerstörung, der Dauer des Einflusses, der Mikroumgebung, der Interaktion mit anderen Zelltypen und dem Alter des Organismus ab (WALTER u. NEUMANN 2009). Chronische Mikrogliaaktivierung kann zu einer mikroglialen Überaktivierung führen, der eine mikrogliale Degeneration folgt (LIU et al. 2001; POLAZZI u. CONTESTABILE 2006). Diese kann wiederum neuronalen Zellverlust induzieren, da nun die neuroprotektive Funktion der Mikroglia entfällt (CZECH et al. 2011). Die klassische Mikrogliaaktivierung kann von Lipopolysacchariden (Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien, LPS) sowie dem proinflammatorischen Zytokin Interferon- γ (IFN- γ) initiiert werden. Diese führt zur Expression von CD86 und CD16/32 und somit zur erhöhten Produktion

von oxidativen Metaboliten (Stickstoffmonoxid und Superoxide) sowie Proteasen und proinflammatorischen Zytokinen (CZEH et al. 2011). Der alternative Weg hingegen wird durch Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-13 (IL-13) induziert. Dies führt zu einer Herunterregulation von Inflammediatoren und trägt somit zur Angiogenese sowie Gewebereparatur bei (CZEH et al. 2011).

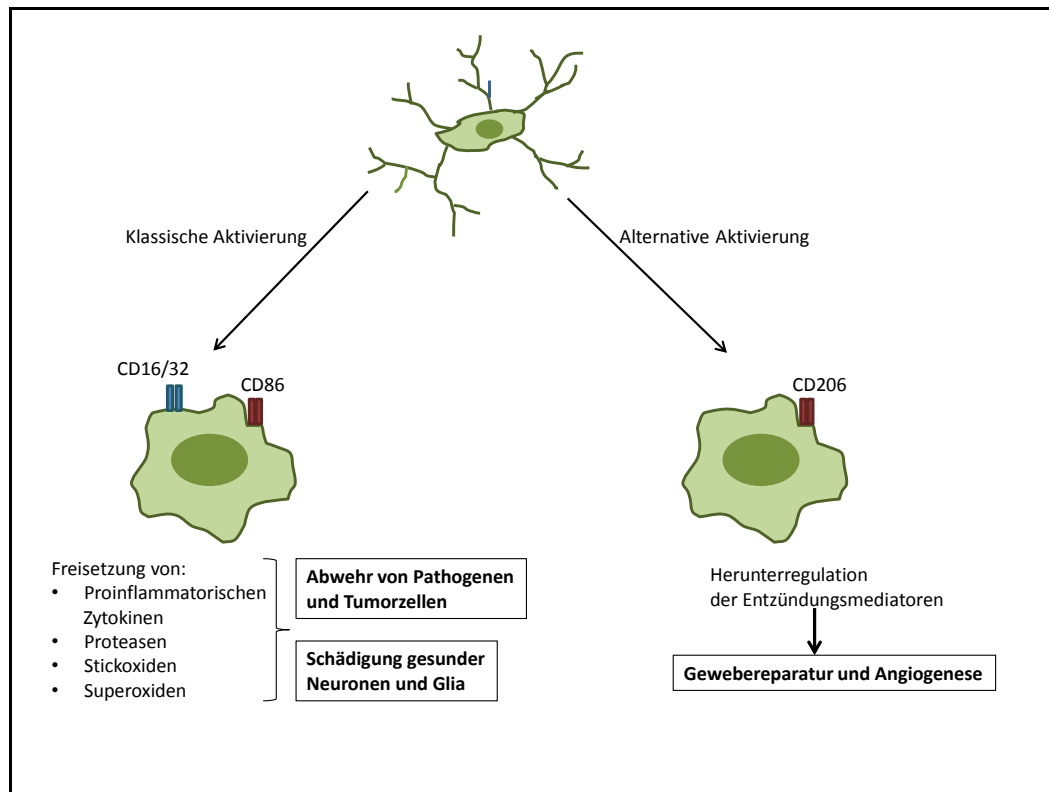


Abb. 3 Schematische Darstellung der Aktivierung mikroglialer Zellen. Modifiziert nach CZEH et al. (2011).

Fast alle Mikrogliazellen exprimieren *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) (LEE u. LEE 2002). Diese transmembranären Glykoproteine tragen dazu bei, das erworbene Immunsystem zu aktivieren. Sobald TLRs in ihrem Umfeld pathogenassoziierte molekulare Muster entdecken, die von Infektionserregern stammen, binden sie an ihre jeweiligen Liganden und vermitteln Signale ins Zellinnere. Dies induziert die Expression proinflammatorischer Gene (MEDZHITOV 2001).

2.4. Bedeutung in der Epileptogenese

In bisherigen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass den Mikrogliazellen eine zentrale Rolle in den Pathomechanismen verschiedenster neurologischer Erkrankungen zukommt (TEISMANN et al. 2003; JACK et al. 2005; WEINSTEIN et al. 2010). Akute epileptische Anfälle verursachen eine

Aktivierung glialer Zellen sowie eine erhöhte Expression von Transkriptionsfaktoren und Zytokinen. Dies führt zur Aktivierung der inflammatorischen Kaskade (ZIMMER et al. 1997; PLATA-SALAMAN et al. 2000). *In vivo*-Studien konnten zeigen, dass die Aktivierung der Mikroglia direkt nach dem SE stattfindet und diese sich hauptsächlich im Hippocampus ansammeln (RAVIZZA et al. 2005). Die anfallsbedingte Aktivierung der Mikrogliazellen und die Hochregulation proinflammatorischer Zytokine können neuronale Erregbarkeit sowie neuronale Schäden (= Neurodegeneration) verursachen. Dies kann wiederum zur Entstehung weiterer epileptischer Anfälle beitragen (TANIWAKI et al. 1996; ZIMMER et al. 1997; RIZZI et al. 2003). Es wird vermutet, dass das Zytokin Interleukin-1 beta (IL-1 β) den NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor beeinflusst und zu einem erhöhten Calcium-Einstrom in die Neurone führt (FARIELLO et al. 1989; ALI u. SALTER 2001). Des Weiteren verursacht die Zytokin-Aktivierung die Synthese der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und der Cyclooxygenase. Die Aktivierung dieser Enzyme führt zu neuronalem Zelltod (ROMERO et al. 1996; ACARIN et al. 2002). Neben dem SE induzieren auch andere Ereignisse wie Trauma, Schlaganfall, virale Infektionen, oder Fieberanfälle eine rasche Aktivierung der Mikroglia. Dies führt wiederum zur Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren (TEMKIN 2009; RAVIZZA et al. 2011).

Demzufolge kann davon ausgegangen werden, dass der Funktion der Mikroglia im Rahmen der Epileptogenese eine bedeutende Rolle zukommt. Die pharmakologische Modulation der Mikrogliafunktion zum neuroprotektiven, antiinflammatorischen Phänotyp schafft einen Ansatzpunkt für neue Therapiemöglichkeiten.

3. Anfallsinduzierte neuronale Plastizität

3.1. Einführung

Die neuronale Plastizität ist essentiell für eine regelgerechte Entwicklung und Funktion des zentralen Nervensystems (ZNS) (GAGE 2002; MING u. SONG 2005). Dies trifft sowohl für das juvenile als auch adulte Gehirn zu. Während der Epilepsieentstehung kommt es zu verschiedensten Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene. Dazu gehört neben der Neurogenese, dem neuronalen Zelltod und der Gliose auch die dendritische und axonale Plastizität (JUTILA et

al. 2002). Der Hippocampus, der unter physiologischen Bedingungen eine bedeutende Rolle bei Lern- und Gedächtnisvorgängen spielt, ist von Epilepsieerkrankungen besonders betroffen (FANG et al. 2011; SODERLUND et al. 2012). Die Körnerzellen des *Gyrus dentatus* stellen als glutamaterge exzitatorische Neurone wichtige Regulatoren des exzitatorischen und inhibitorischen Gleichgewichts im Gehirn dar. Sie bilden das Verbindungsstück zwischen dem entorhinalen Cortex und den hippocampalen Pyramidenzellen der CA₂- und CA₃-Region und können somit den exzitatorischen Input, der den Hippocampus erreicht, limitieren (HSU 2007).

3.2. Hippocampale Neurodegeneration

Diese Veränderungen können in drei verschiedene Stadien unterteilt werden. Zu Beginn steht die initiale Phase, welche durch den schnellen neuronalen Zelltod durch Glutamat charakterisiert ist. Dieser Prozess nennt sich Exzitotoxizität. Vermehrt ausgeschüttetes Glutamat bewirkt einen erhöhten Einstrom von Calciumionen in das Zellinnere der Neuronen (DUBINSKY 1993). Dies aktiviert eine zytotoxische Kaskade (MANEV et al. 1989). Im Rahmen der sekundären Phase folgen die Aktivierung apoptotischer Prozesse sowie die Aktivierung proinflammatorischer Kaskaden und demzufolge die Produktion von Zytokinen (HOLOPAINEN 2008). Des Weiteren werden in dieser Phase neurotrophische Faktoren freigesetzt. Während der dritten und längsten Phase kommt es zu Veränderungen zellulärer Verbindungen, synaptischer Reorganisation sowie funktionellen Veränderungen sowohl im als auch außerhalb des Hippocampus (HOLOPAINEN 2008). Der Prozess der Reorganisation bewirkt zudem Veränderungen hinsichtlich der Krampfschwellen. Dies wird insbesondere durch die nicht provozierten, spontanen Anfälle deutlich. Diese führen wiederum zu Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene und bewirken somit langfristige Lern- und Gedächtnisdefizite (HOLOPAINEN 2008). Insbesondere der Hilus und die CA₁-Region der Pyramidenzellschicht erscheinen von der Neurodegeneration betroffen. Weniger beschädigt dagegen sind die CA₂- und CA₃-Regionen (JUTILA et al. 2002). Gliazellen wandern zu den neurodegenerativen Veränderungen. Diese proliferieren und hypertrophieren dort (= Gliose). Diese Veränderungen führen zur Schrumpfung des Hippocampus sowie einer Verfestigung des Gewebes (FALCONER u. TAYLOR 1968; BERNASCONI et al. 2003).

3.3. Neurogenese

Eine weitere neuropathologische Veränderung, welche im Zusammenhang mit Epilepsieerkrankungen auftritt, stellt die Neubildung von Neuronen (=Neurogenese) dar (CRESPEL et al. 2005; SIEBZEHRUBL u. BLUMCKE 2008; ENGEL et al. 2011). Die Neurogenese umfasst dabei die Proliferation, Migration und Differenzierung von Neuroblasten sowie die synaptische Integration neugebildeter Neurone (ANDRES-MACH et al. 2011). Der Prozess der Neurogenese findet in der subgranulären Zone (SGZ) des *Gyrus dentatus* (GD) des Hippocampus und der subventrikulären Zone (SVZ) des anteriolateralen Seitenventrikes lebenslang statt (KAPLAN u. BELL 1984; GAGE 2002). Die neuronalen Vorläuferzellen wandern nach der Proliferation in die darüber liegende Körnerzellschicht, um dort zu Körnerzellen auszudifferenzieren (ALTMAN u. DAS 1965; CAMERON et al. 1993; KUHN et al. 1996). Die Integration in das neuronale Netzwerk des Hippocampus ist zum einen durch die Verbindung der neugebildeten Neurone, über deren Dendriten zur Molekularschicht des GD bedingt und zum anderen über die Verbindung zu den Pyramidenzellen des Hilus und der CA₃-Region (HASTINGS u. GOULD 1999; MARKAKIS u. GAGE 1999; VAN PRAAG et al. 2002). Insbesondere hinsichtlich der Lern- und Gedächtnisleistung ist die Neurogenese im Bereich des Hippocampus von großer Bedeutung (SHORS et al. 2001). Unter pathologischen Umständen ist eine gesteigerte Neurogenese zu beobachten, welche durch epileptische Anfälle und die damit assoziierten Veränderungen in der Mikroumgebung der SGZ bedingt ist (BENGZON et al. 1997; HATTIANGADY u. SHETTY 2008; KOKAIA 2011). Die dabei neugebildeten, ektopischen Körnerzellen können abnorme spontane Entladungen (*burstings*) aufweisen, wodurch sie prokonvulsiv wirken könnten (SCHARFMAN et al. 2000; ZHAN et al. 2010). Als weitere neuropathologische Veränderung ist das Aussprosseln von Axonen der Körnerzellen des GD (=Moosfasern) zu beobachten (PARENT et al. 1997). Diese bilden mit den Dendriten benachbarter Zellen des GD Synapsen, wodurch ein exzitatorischer Kreislauf entsteht (OKAZAKI et al. 1995). Das Aussprosseln der Moosfasern ist mit dem Schweregrad der Epilepsie assoziiert. Dieser ist wiederum abhängig von der Anfallsfrequenz (SUTULA 2002; NADLER 2003).

3.4. Neuronale Plastizität und Mikroglia

Mikrogliazellen beeinflussen die synaptische Aktivität durch die Ausschüttung verschiedener Zytokine (MORRIS et al. 2013). Man geht davon aus, dass die ruhende Mikroglia die synaptische Aktivität kontinuierlich überwacht (KHALAF u. TAEGTMEYER 2012). Verschiedene Studien konnten darstellen, dass die von der Mikroglia produzierten Zytokine eine wichtige Rolle bei anfallsassoziierten pathologischen Veränderungen im Hippocampus (neuronaler Zelltod, Neurogenese, reaktive Gliose sowie das Aussprosseln der Moosfasern) spielen (MCNAMARA 1994; PARENT u. LOWENSTEIN 1997; JANKOWSKY u. PATTERSON 2001). Im Anschluss an einen Insult setzt die Mikroglia verschiedene inflammatorische Zytokine frei. Dadurch kann sie zu diesen Entzündungsvorgängen beitragen (BENVENISTE 1992; KREUTZBERG 1996). Des Weiteren sind mikrogliale Zellen in der Lage Glutamat freizusetzen. Dieser exzitatorische Neurotransmitter kann zu exzitotoxischer Neuronendegeneration sowie zum Zelltod glialer Zellen führen (CZECH et al. 2011). Für die Mikroglia konnte jedoch zudem ein neuroprotektiver Effekt nachgewiesen werden, welcher zur Neuroregeneration beiträgt. Dieser wird durch die Sekretion von *transforming growth factor β* , *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), Neurotrophin-3 und dem *nerve growth factor* vermittelt (ELKABES et al. 1996; MIWA et al. 1997).

4. Prüfung der Wirksamkeit des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon

4.1. Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma (PPAR γ)

Die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) gehören neben Steroid-, Thyroid- und Retinoidrezeptoren zur Superfamilie der nuklearen Hormonrezeptoren (HENEKA u. LANDRETH 2007). Hierbei handelt es sich um durch Liganden aktivierte Transkriptionsfaktoren. Dabei werden folgende drei Isotypen differenziert: PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ (DESVERGNE u. WAHLI 1999).

PPAR γ ist auch bekannt als NR1C3 (*nuclear receptor subfamily 1, group C, member 3*). Dieser Rezeptor wird in verschiedenen Geweben, wie zum Beispiel weißen und braunen Adipozyten, Makrophagen, Skelettmuskelzellen, Leberzellen und β -Zellen des Pankreas exprimiert (ESCHER et al. 2001; ROSEN et al. 2003;

HEVENER et al. 2007). Dabei wird zwischen den Unterformen PPAR γ 1 und PPAR γ 2 unterschieden. Diese differieren nur hinsichtlich ihres Aminosäureendes, jedoch nicht hinsichtlich ihrer Funktion (MORAES et al. 2006). PPAR γ 1 ist hauptsächlich in Fettgewebe, Kolon, Milz, Retina und hämatopoetischen Zellen zu finden, wohingegen PPAR γ 2 vor allem in braunem und weißem Fettgewebe vorhanden ist (TONTONOZ et al. 1994). Die PPAR-Isotypen werden von unterschiedlichen Genen codiert. Trotzdem besitzen sie vergleichbare DNA- und Liganden-bindende Domänen (MORAES et al. 2006).

Diese Rezeptoren, PPARs, bestehen aus insgesamt vier Domänen:

- 1.) Die N-terminale A/B-Domäne ist an der Liganden-unabhängigen Transaktivierungsfunktion beteiligt.
- 2.) Die C-Domäne bildet eine aus über 70 Aminosäuren bestehende DNA-bindende Domäne (= DBD) (MANGELSDORF et al. 1995) und besteht aus zwei Zinkfingern, die über eine α -helikale DNA-Struktur miteinander verbunden sind (SCHWABE et al. 1993).
- 3.) Die D-Domäne, die auch als *hinge domain* (= Gelenkdomäne) bezeichnet wird, verbindet die DBD mit der Liganden-bindenden Domäne.
- 4.) Die E/F-Domäne, welche auch als C-terminale, Liganden-bindende Domäne (= LBD) bezeichnet wird, besteht aus einer α -helikalen *Sandwich*-Struktur mit einer zentral gelegenen hydrophoben Tasche (MANGELSDORF et al. 1995; BERNARDO u. MINGHETTI 2006).

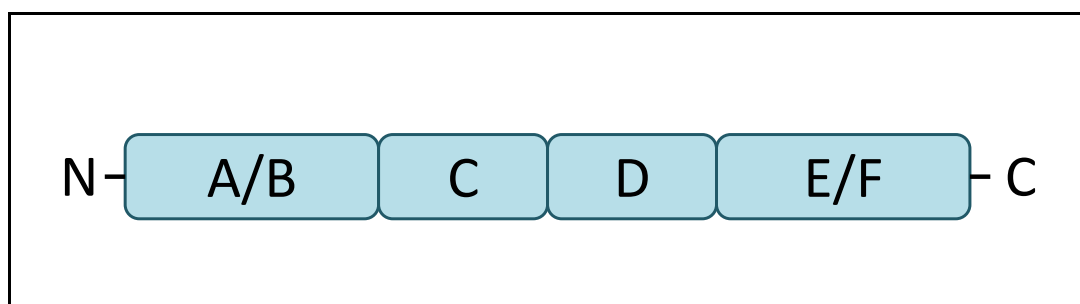


Abb. 4 Aufbau des PPAR γ (modifiziert nach MORAES et al. (2006)). Die N-terminale A/B-Domäne ist an der Liganden-unabhängigen Transaktivierungsfunktion beteiligt. Die C-Domäne stellt die DNA-bindende Domäne (DBD) dar. Die D-Domäne dient als Verbindungsstück der DBD und der E/F-Domäne. Diese wird auch Liganden-bindende Domäne genannt (LBD).

Im Rahmen der Transkription bilden die PPARs mit einem Retinoid-X-Rezeptor

ein Heterodimer (KLIOWER et al. 1992). Die Aktivierung dieses Heterodimers erfolgt durch PPAR- oder Retinoid-X-Agonisten (DAYNES u. JONES 2002). Durch die Bindung dieser Agonisten wird das Heterodimer aktiviert und bindet an sogenannte *PPAR response elements* (PPREs), die in der Promotorregion des Zielgens vorhanden sind (KLIOWER et al. 1992; FEIGE et al. 2005). Dadurch wird die Expression von Genen initiiert (JONES et al. 2002). Die PPREs bestehen aus der Sequenz „AGGTCA“ (IJPENBERG et al. 1997). Der Retinoid-X-Rezeptor bindet an die C-terminale Domäne des PPARs und die 3'-Seite des PPREs. Der PPAR verbindet sich mit dem PPRE über dessen 5'-Seite (IJPENBERG et al. 1997; KERSTEN u. WAHLI 2000). Sind keine Liganden in der Nähe, werden die PPARs durch Co-Repressor-Proteine besetzt. Diese unterdrücken die Gentranskription und inaktivieren somit den Rezeptor. Durch die Bindung eines Liganden wird das Co-Repressor-Protein abgespalten und durch einen Co-Aktivator-Komplex ersetzt (JONES et al. 2002). Dieser Komplex besteht aus dem PPAR-Liganden-Protein und dem Steroidrezeptor-Co-Aktivator-1, welche im Zytoplasma lokalisiert sind und zum Zellkern transferieren (ZHU et al. 1997).

PPARs beeinflussen sowohl den Fett-, Glukose- und Energiestoffwechsel als auch die Differenzierung von Makrophagen und Adipozyten. Die Aktivierung des PPAR γ , auf welche im Folgenden näher eingegangen werden soll, fördert unter anderem die Adipogenese und erhöht die Insulinaktivität (SPIEGELMAN 1998; ROSEN et al. 1999; BERNARDO u. MINGHETTI 2006). Die Aktivierung dieses Rezeptors kann zudem eine entzündungshemmende Wirkung hervorrufen (RICOTE et al. 1998). Durch die Unterdrückung der Signalwege verschiedener Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), AP-1 (*activated protein-1*), STAT-1 (*signal transducer and activator of transcription*), N-FAT (*nuclear factor of activated T cell*), Erg-1 (*erythroblast transformation specific-related gene*), Jun und GATA-3 besitzen PPAR γ -Agonisten eine antiinflammatorische Wirkung. Dadurch kommt es beispielsweise zur Unterdrückung der Expression von Adhäsionsmolekülen sowie der T- und B-Zell-Proliferation und -Differenzierung. Des Weiteren kann die Chemotaxis eosinophiler Granulozyten und die Monozyten- oder Makrophagenaktivität reduziert werden (MORAES et al. 2006). Das Eingreifen in die beschriebenen Signalwege wird als Transrepression bezeichnet. Diese Transrepression ist DNA-

unabhängig. Der Rezeptor bindet dabei an Co-Aktivatoren, die an der Aktivierung diverser proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren beteiligt sind oder an die Transkriptionsfaktoren selbst. Dies vermittelt seine entzündungshemmende Wirkung (KODERA et al. 2000; LI et al. 2000; YANG et al. 2000).

PPAR γ in der Mikroglia

PPAR γ wird unter anderem im Gehirn exprimiert. Dabei stellen die Neuronen die Mehrheit der Zellen, in denen der Rezeptor vorhanden ist, dar. In den Neuronen des Hypothalamus haben PPAR γ -Rezeptoren beispielsweise die Aufgabe das Energiegleichgewicht, autonome Funktionen und den Metabolismus von Glucose zu kontrollieren (SARRUF et al. 2009). Des Weiteren sind PPAR γ -Rezeptoren in den neuronalen Zellen des Hippocampus, einer wichtigen Region für die Lern- und Gedächtnisleistung, zu finden (INESTROSA et al. 2005). In den Mikrogliazellen stellt PPAR γ die vorherrschende Isoform dar (JONES et al. 2002). In mehreren *in vivo*-Studien konnten bereits gezeigt werden, dass PPAR γ eine wichtige Rolle bei der Aktivierung mikroglialer Zellen spielt (BERNARDO et al. 2000; LUNA-MEDINA et al. 2005; BERNARDO u. MINGHETTI 2006; XU u. DREW 2007). Die Beeinflussung des PPAR γ in Mikrogliazellen und die dadurch vermittelte antiinflammatorische Wirkung wird momentan als wichtige Strategie zur Behandlung verschiedenster neurodegenerativer Erkrankungen diskutiert (CARTA u. PISANU 2013). Vielversprechende Forschungsergebnisse führten zur klinischen Prüfung der PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon und Pioglitazon bei Patienten, die an Alzheimer erkrankt sind (WATSON et al. 2005; HANYU et al. 2009; HARRINGTON et al. 2011). Jedoch wurde weder Rosiglitazon noch Pioglitazon für diese Indikation zugelassen (GOLD et al. 2010a; MILLER et al. 2011).

4.2. PPAR γ -Agonisten

PPAR γ -Agonisten lassen sich in natürliche und synthetische Liganden differenzieren. Mittellange- sowie langkettige Fettsäuren und Eikosanoide werden zu den natürlichen Liganden gezählt. Zu den synthetischen Liganden gehören sowohl Peroxisom-Proliferatoren und hypolipämische als auch insulinsensitivierende Substanzen (WILLSON u. WAHLI 1997). Neben den nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAIDs) Ibuprofen, Fenoprofen und Indomethacin zählen die Thiazolidindione zu den bekanntesten synthetischen

Liganden (ESPOSITO et al. 2007; BERNARDO u. MINGHETTI 2008; AJMONE-CAT et al. 2012).

Thiazolidindione (TZDs)

Die Substanzen dieser Stoffgruppe erhöhen die Insulinsensitivität. Demzufolge werden sie bereits zur Behandlung des Typ 2 *Diabetes mellitus* verwendet (WILLSON et al. 2001). Des Weiteren fördern sie die Adipogenese und können die Proliferation von glatten Muskelzellen in Gefäßwänden verhindern (WAKINO et al. 2000). Zudem wurde bereits in mehreren Studien eine antinflammatorische Wirkung der TZDs nachgewiesen (CELINSKI et al. 2012; CARTA u. PISANU 2013; JIN et al. 2013). TZDs liegen als Racemat vor. Lediglich das (S)-Enantiomer ist in der Lage aktiv an PPAR γ zu binden. Folglich liegt die Hälfte der Substanzen in einem inaktiven Zustand vor (PARKS et al. 1998). Zu den TZDs gehören beispielsweise Rosiglitazon, Pioglitazon und Troglitazon. Da im Rahmen des vorliegenden Dissertationsvorhabens das TZD Rosiglitazon verwendet wurde, wird dieses nachfolgend genauer beschrieben.

4.3. Rosiglitazon

Der Wirkstoff Rosiglitazon wird als PPAR γ -Agonist zu der Stoffgruppe der Thiazolidindione gezählt (LEHMANN et al. 1995). Aufgrund der Fähigkeit die Blutglukosekonzentration zu senken, wurde Rosiglitazon unter dem Namen Avandia[®] (GlaxoSmithKline, Brentford, England) zur Behandlung des Typ 2 *Diabetes mellitus* eingesetzt (LEHMANN et al. 1995; WILLSON et al. 2001). Das Medikament wurde 2010 wegen eines erhöhten Herzinfarktrisikos vom Markt genommen (MARKS 2013). PPAR γ -Agonisten beeinflussen den Lipidstoffwechsel durch die Regulation der Transkription verschiedener Gene (SARAFIDIS u. BAKRIS 2006; SARAFIDIS u. LASARIDIS 2006; SARAFIDIS 2008). Durch Rosiglitazon erhöhen sich die Konzentration des Gesamtcholesterol sowie des *High-Density*-Lipoprotein-Cholesterol (HDL-C). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Rosiglitazon die Partikelkonzentration des *Low-Density*-Lipoprotein-Cholesterols (LDL-C) steigert und dessen Partikelgröße reduziert (CHIQUELLE et al. 2004). Dies führt zur Flüssigkeitsretention und erhöht somit das Risiko an einem Herzinfarkt zu erkranken (ZHANG et al. 2005; 2011). Die Metabolisierung von Rosiglitazon zu einem inaktiven Metaboliten erfolgt hauptsächlich in der Leber über Cytochrom P450 (CYP) 2C8. Der übrige

Anteil, ungefähr ein Prozent, wird in unveränderter Form über den Urin ausgeschieden (SNYDER u. BERNIS 2004; KRENTZ u. BAILEY 2005). Mit Hilfe einer *in vivo*-Studie an Gerbils konnte bereits nachgewiesen werden, dass Rosiglitazon die Blut-Hirn-Schranke passiert (SHEU et al. 2011).

Neben den Auswirkungen auf den Stoffwechsel konnten für Rosiglitazon zusätzlich entzündungshemmende Effekte im zentralen Nervensystem beobachtet werden (BALDWIN et al. 1999; BERNARDO u. MINGHETTI 2006; HENEKA u. LANDRETH 2007). PPAR γ -Agonisten gelten durch ihre antiinflammatorische Wirkung als vielversprechende Therapiemöglichkeit bei einer Vielzahl von neurologischen Erkrankungen. In einem zerebralen Ischämie-Modell reduzierten synthetische PPAR γ -Agonisten, wie beispielsweise Rosiglitazon, die Produktion proinflammatorischer Zytokine. Dieser Effekt konnte durch PPAR γ -Antagonisten aufgehoben werden (LUO et al. 2006; PEREIRA et al. 2006; TUREYEN et al. 2007). Bei einem Tiermodell der multiplen Sklerose reduzierte das TZD Pioglitazon die Gliose sowie die Immunreaktion (KIAEI et al. 2005). Für verschiedene PPAR γ -Agonisten konnte in Parkinson-Modellen bereits ein positiver Effekt nachgewiesen werden (CARTA u. PISANU 2013). Dabei konnte insbesondere für Rosiglitazon in einem progressiven Parkinson-Modell eine antiinflammatorische sowie neuroprotektive Wirkung festgestellt werden (CARTA et al. 2011). In einem chirurgischen Schädel-Hirn-Trauma-Modell schwächte Rosiglitazon die Entzündung ab (HYONG et al. 2008). Bei einem embolischen Schlaganfallmodell reduzierte die Behandlung mit Rosiglitazon das Infarktvolumen (ALLAHTAVAKOLI et al. 2007). Auch in Alzheimer-Modellen wies Rosiglitazon neuroprotektive Effekte auf (LANDRETH et al. 2008; ESCRIBANO et al. 2010). Aufgrund der klinischen Testphase sowie der derzeitigen Sicherheitsdaten wurde jedoch Rosiglitazon nicht für diese Indikation zugelassen (GOLD et al. 2010b; MILLER et al. 2011). In einem akuten SE-Modell konnte bereits dargestellt werden, dass Rosiglitazon einen neuroprotektiven sowie antiinflammatorischen Effekt besitzt. Dieser wurde durch die Unterdrückung der Produktion reaktiver Sauerstoffradikale und Lipidperoxide sowie die Steigerung der antioxidativen Funktion der Superoxid-Dismutase und Glutathion vermittelt (YU et al. 2008). Des Weiteren reduzierte Rosiglitazon kognitive Defizite und verhinderte zudem die Astrozytenaktivierung sowie oxidative Schäden infolge eines Pilocarpin-induzierten SE (HONG et al. 2012). In

einer weiteren Studie konnte festgestellt werden, dass Rosiglitazon im Rahmen eines Pilocarpin-Modells den neuronalen Zellverlust im Hippocampus verhindert sowie die erhöhte Expression inflammatorischer Transkriptionsfaktoren reduziert. Auch wurde durch die Behandlung mit Rosiglitazon das Auftreten wiederkehrender spontaner Anfälle unterdrückt (HONG et al. 2013). Im Rahmen dieser Studien von Rosiglitazon an SE-Modellen wurde jedoch nicht die Beeinflussung der Epileptogenese evaluiert. Der PPAR γ -Agonist wurde jeweils vor SE verabreicht, so dass der Insult (hier der SE) bereits moduliert wurde. Während der nachfolgenden Latenzzeit bis zur Entwicklung spontaner Anfälle (Epileptogenese) wurde Rosiglitazon jedoch nicht verabreicht.

Im Rahmen einer bislang unveröffentlichten Studie konnten wir nachweisen, dass der PPAR γ -Rezeptor im Bereich des piriformen Cortex bei epileptischen Tieren, verglichen mit der dazugehörigen Kontrollgruppe, vermehrt exprimiert wurde. Beiden Tiergruppen wurde eine Vehikellösung appliziert.

5. Verhaltensuntersuchungen

5.1. Einführung

Psychiatrische und kognitive Beeinträchtigungen sind häufig mit Epilepsieerkrankungen assoziiert, wobei insbesondere pharmakoresistente Epilepsiepatienten betroffen sind (TITLIC et al. 2009). Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass auch in Tiermodellen experimentell induzierter Epilepsie Verhaltensstörungen sowie kognitive Defizite auftreten (BRANDT et al. 2006; SEEGER et al. 2011). Um diese Komorbiditäten im Tiermodell genauer zu untersuchen, sind Verhaltensmodelle unumgänglich. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte jedoch beachtet werden, dass die gewonnenen Erkenntnisse aus den Tiermodellen nicht immer mit dem menschlichen Verhaltensweisen korrelieren (STAFSTROM 2006).

5.2. Verhaltensmodelle

5.2.1. Open Field

Calvin Hall, der Erfinder des *Open Fields* (OF), untersuchte mit Hilfe dieses Verhaltenstest den Kotabsatz der Tiere und bestimmte dadurch den Grad des angstassoziierten Verhaltens der Tiere (HALL 1934). Dieser Test hat sich durch

die einfachen und schnellen Messungen klar definierter Verhaltensweisen bewährt (WALSH u. CUMMINS 1976; PRUT u. BELZUNG 2003). Das OF kann bezüglich der Form der Apparatur, der Beleuchtung und der Anreicherung von Objekten variieren (PRUT u. BELZUNG 2003). Das zu untersuchende Tier wird in das OF und somit in eine fremde Umgebung gesetzt, die von Wänden begrenzt wird (WALSH u. CUMMINS 1976). Normalerweise suchen Nagetiere bevorzugt den äußeren Bereich des OF und damit die Nähe zur Wand auf. Sie laufen an der Begrenzung entlang, da sie diese mit ihren Vibrissen orten können (= Thigmotaxis). Das Verhalten der Tiere im OF ist einerseits durch Angst vor der unbekannten Umgebung und Fluchtbereitschaft andererseits jedoch auch durch einen hohen Erkundungsdrang geprägt. Weisen die Tiere ein reduziertes angstassoziiertes Verhalten auf, so verbringen sie mehr Zeit im inneren Kompartiment der Apparatur (PRUT u. BELZUNG 2003). Neben dem Angstverhalten sowie dem exploratorischen Verhalten wird auch die Aktivität der Tiere untersucht (WALSH u. CUMMINS 1976). In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Ratten bei denen ein elektrischer SE induziert wurde, im Rahmen des Tests eine längere Strecke verglichen mit ihrer Kontrollgruppe zurücklegten. Dies lässt auf ein hyperaktives Verhalten schließen, welches auch bei Humanpatienten zu beobachten ist (KONESKI u. CASELLA 2010; SEEGER et al. 2011).

5.2.2. Black White Box

Die *Black White Box* (BWB) wurde 1980 erstmals von Crawley und Goodwin beschrieben. Die Testapparatur besteht aus einem weißen und einem schwarzen Kompartiment, die durch einen Durchgang miteinander in Verbindung stehen (CRAWLEY u. GOODWIN 1980). Um das angstassoziierte Verhalten der Tiere zu bestimmen, werden neben der Aufenthaltsdauer in den einzelnen Kompartimenten auch die Aktivität sowie die Körperhaltung der Tiere gemessen. Im schwarzen Teil der BWB zeigen gesunde Nagetiere im Gegensatz zum weißen Kompartiment verminderte Aktivität und richten sich seltener auf, um die Umgebung zu erkunden (CRAWLEY 1981; BLUMSTEIN u. CRAWLEY 1983). Vermindertes angstassoziiertes Verhalten führt zur vermehrten Erkundung und folglich einer verlängerten Aufenthaltsdauer im weißen Kompartiment (CHAOULOFF et al. 1997).

5.2.3. Elevated Plus Maze

Das *Elevated Plus Maze* (EPM) wurde von Handley und Mithani ursprünglich zur Untersuchung des angstassoziierten Verhaltens von Nagetieren verwendet (HANDLEY u. MITHANI 1984). Das EPM besteht aus vier Armen, die jeweils im rechten Winkel zueinander angeordnet sind und somit die Form eines Kreuzes einnehmen. Zwei sich gegenüberliegende Arme sind von seitlichen Begrenzungswänden umgeben. Die anderen beiden Arme besitzen keine Begrenzungswände (HANDLEY u. MITHANI 1984). Handley und Mithani untersuchten mit Hilfe des EPM die Wirkung anxiolytischer und anxiogener Substanzen. Dabei wurde die Aufenthaltsdauer der Tiere auf den offenen Armen gemessen (HANDLEY u. MCBLANE 1993). Auch hinsichtlich der BWB basiert das Prinzip des Tests auf dem natürlichen Verhalten von Nagetieren ungeschützte Bereiche zu meiden, um Fressfeinden zu entgehen (MONTGOMERY 1955). Während der Untersuchung werden verschiedene Verhaltensparameter wie beispielsweise die Zeitdauer des Aufenthalts auf dem jeweiligen Arm sowie die Anzahl der Wechsel zwischen den vier Armen aufgezeichnet (PELLOW et al. 1985). Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich Ratten, bei denen ein elektrischer SE ausgelöst wurde, vermehrt auf den ungeschützten, offenen Armen des EPM aufhalten (SEEGER et al. 2011).

5.2.4. Morris Water Maze

Das *Morris Water Maze* (MWM) wurde von Richard Morris entwickelt und dient vor allem der Untersuchung des räumlichen Lern- und Gedächtnisvermögens bei Nagetieren (MORRIS 1984). Bei diesem Test sollen die Tiere mit Hilfe von Hinweisen aus der Umgebung (*Cues*) lernen eine verborgene Plattform in einem wassergefüllten Becken aufzusuchen (MORRIS 1984). Die Plattform wird für die Tiere unsichtbar, indem man beispielsweise dem Wasser opake Mittel zusetzt oder die Plattform dieselbe Farbe wie das Schwimmbecken aufweist (VORHEES u. WILLIAMS 2006). Gesunde Tiere lernen im Verlauf des Experiments direkt die Plattform aufzusuchen, indem sie sich an den angebrachten Signalen im Raum orientieren. Tiere, deren Gehirn geschädigt ist (z.B. Läsionen im Hippocampus) oder denen Medikamente verabreicht werden, können Defizite in ihrem Lernverhalten aufweisen (MORRIS et al. 1982; SUTHERLAND et al. 1982; SUTHERLAND et al. 1983). Diese Verhaltensuntersuchung eignet sich insbesondere zur Evaluierung der Effekte des Alterns, experimentell zugefügter

Läsionen sowie der Effekte von Wirkstoffen auf die räumliche Lern- und Gedächtnisleistung (MORRIS 1984).

III. ZIELSETZUNG UND ARBEITSHYPOTHESEN

Ziel dieses Dissertationsvorhabens war es mit Hilfe zweier chronischer Epilepsiemodelle den PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon als mögliche Präventivmaßnahme für Risikopatienten der Epilepsie zu prüfen. Dabei sollte der Effekt von Rosiglitazon auf die Epileptogenese untersucht werden. Des Weiteren sollte die Beeinflussung der epilepsieassoziierten Komorbiditäten, kognitiven Defizite sowie die entzündungshemmende Wirkung von Rosiglitazon evaluiert werden. In mehreren Studien verschiedener neurologischer Erkrankungen konnte bereits eine entzündungshemmende Wirkung durch Rosiglitazon nachgewiesen werden (BALDWIN et al. 1999; KIAEI et al. 2005; BERNARDO u. MINGHETTI 2006; HENEKA u. LANDRETH 2007; LANDRETH et al. 2008; CARTA u. PISANU 2013). Des Weiteren konnten schon in chemisch induzierten Epilepsiemodellen antiinflammatorische sowie neuroprotektive Effekte durch Rosiglitazon vermittelt werden (YU et al. 2008; CHUANG et al. 2012; HONG et al. 2012; HONG et al. 2013). Die Beeinflussung von Rosiglitazon auf die Epilepsieentstehung wurde allerdings bisher noch nicht untersucht.

Post-Status-Epilepticus-Modell

Durch dieses Modell entwickeln die Tiere nach einer gewissen Latenzzeit spontane epileptische Anfälle. Die Substanz Rosiglitazon sollte daher auf einen antiepileptogenen Effekt geprüft werden. Um eine mögliche metabolische Wirkung der verwendeten Dosierung von Rosiglitazon zu überprüfen, wurde der Blutglukosespiegel der Tiere vor und am Ende der Applikationsphase gemessen. Des Weiteren wurde mit Hilfe verschiedener Verhaltensuntersuchungen untersucht, ob Rosiglitazon einen Einfluss auf die Entwicklung epilepsieassoziierten kognitiver Defizite aufweist. Zur Evaluierung antiinflammatorischer und neuroprotektiver Effekte durch die Behandlung mit Rosiglitazon wurden zudem immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt.

Amygdala-Kindling-Modell

Anhand des Amygdala-Kindling-Modells sollte ein akuter Effekt von Rosiglitazon auf Anfallsschwelle, Anfallsdauer und Krampfschwere ausgeschlossen werden. Der Ausschluss einer akuten Wirkung von Rosiglitazon diente der Auswahl einer nicht antikonvulsiven Dosierung für das *Massive Kindling*. Dabei wurde der

Einfluss von Rosiglitazon auf die Epileptogenese untersucht. Im Anschluss an das *Massive Kindling* sollte die Wirksamkeit von Rosiglitazon auf ein subtherapeutisch dosiertes Standardantiepileptikum evaluiert werden.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Prüfung des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon im Post-Status-Epilepticus-Modell der Temporallappenepilepsie

1.1. Versuchstiere

Unter dem Titel “Charakterisierung der epileptogenese-assoziierten Mikrogliafunktion und deren pharmakologische Modulation” wurde das Versuchsvorhaben von der Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-173 genehmigt. Für die Untersuchung wurden weibliche Ratten (*Rattus norvegicus forma domestica*) vom Stamm Sprague Dawley (Harlan Winkelmann, Niederlande) verwendet. Bei ihrer Ankunft hatten die Versuchstiere ein Körpergewicht von 175-200 g. Die Tiere wurden einzeln in einem klimatisierten und für Labornager konzipierten Raum in Makrolonkäfigen Typ III (EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH und Co.KG, Emmendingen) gehalten. Diese Käfige wurden mit Weichholzgranulat (Grade 5, Altromin GmbH, Lage) eingestreut. Die Tiere erhielten eine Standarddiät (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) sowie Leitungswasser *ad libitum*. Das Futter wurde nach Bedarf aufgefüllt und das Leitungswasser zweimal pro Woche erneuert. Eine gründliche Reinigung und Desinfektion der Käfige sowie der Haltungsräume und aller damit verbundenen Gegenständen wurde einmal wöchentlich durchgeführt. Um den Stressfaktor zu minimieren, fand das Umsetzen der Ratten in einen frisch hergerichteten Käfig mit einem Abstand von 1-2 Tagen vor den Experimenten statt. Die Umgebungstemperatur im Tierhaus, in dem die Ratten gehalten wurden, lag zwischen 22-24 °C und die relative Luftfeuchtigkeit zwischen 46-59 %. Der Versuchsbeginn startete 25 Tage nach Ankunft der Tiere. Um die circadianen Einflüsse möglichst gering zu halten, begannen die Versuche immer zwischen 7.00 und 9.00 Uhr MEZ (STEWART et al. 2001).

1.2. Post-Status-Epilepticus-Modell

1.2.1. Implantation der Elektrode

Unter Verwendung eines Stereotakten (TSE Systems GmbH, Homburg) konnte die genaue Positionierung der Ableitungs- und Stimulationselektrode (bipolare Elektrode aus rostfreiem Stahl mit einer Ummantelung aus Teflon) gewährleistet

werden. Die Ratten wurden mittels Chloralhydrat (360 mg/kg in 10 ml/kg 0,9%iger NaCl-Lösung i.p.; Merck KGaA, Darmstadt) narkotisiert. Um die Schmerzempfindung zu limitieren, wurde den Tieren mindestens 30 Minuten vor der OP und 24 Stunden danach Meloxicam (Metacam®, Boehringer Ingelheim, Ingelheim/Rhein; 1 mg/kg in 1 ml/kg Aqua ad injectabilia) subkutan (s.c.) verabreicht. Nach dem Einspannen in den stereotaktischen Apparat wurde den Ratten das Lokalanästhetikum Bupivacain 0,5% (Jenapharm®, mibe GmbH, Brehna) s.c. in den zu eröffnenden Hautbereich injiziert. Zur Feststellung der Narkosetiefe wurde regelmäßig der Zwischenzehenreflex überprüft. Für die exakte Implantation der Elektrode wurde der stereotaktische Atlas von PAXINOS und WATSON (2005) herangezogen. In diesem Atlas wird die Lage der Hirnstrukturen in Bezug zu Bregma (rostraler Kreuzungspunkt der Schädelknochnähte) dargestellt. Bregma und Lambda (kaudaler Kreuzungspunkt der Schädelknochnähte) lagen während der Implantation auf gleicher Höhe. Dies wurde gewährleistet, indem die Oberkieferhalterung des stereotaktischen Apparates auf -3,9 mm ventral der Interaurallinie eingestellt wurde (PAXINOS u. WATSON 2005).

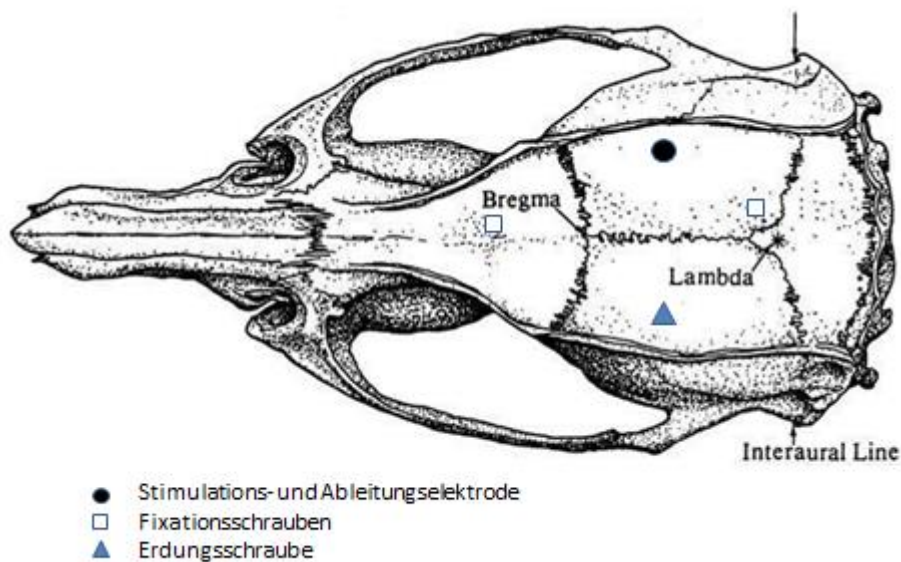


Abb. 5 Aufsicht auf den Rattenschädel mit Darstellung der Lokalisation der Stimulations- und Ableitungselektrode, der Fixationsschraube und der Erdungsschraube. Modifiziert nach PAXINOS u. WATSON (2005).

Die exakte Positionierung der Stimulations- und Ableitungselektrode erfolgte durch die Koordinaten anterior posterior (ap) + 2,2; laterolateral (lat) + 4,7 und

dorsoventral (dv) + 8,5 im Bezug zur Lage des Bregmas. (PAXINOS u. WATSON 2005) Kranial und kaudal der Stimulations- und Ableitungselektrode wurde jeweils eine Fixationsschraube aus rostfreiem Edelstahl (Schrauben-Preisinger GmbH, München) angebracht. Gegenüber der Elektrode wurde eine Erdungsschraube aus rostfreiem Edelstahl (Schrauben-Preisinger GmbH, München) in die Schädeldecke positioniert. Letztere wurde mit einer Teflonummantelnden Erdungselektrode verbunden. Zur Stabilisierung der Elektrode und den Schrauben am Schädel diente kaltpolymerisierender Kunststoff (Paladur[®], Heraeus Kulzer GmbH, Hanau). Um eventuell entstehende Wundinfektionen zu vermeiden, bestand die Schicht des Kunststoffes, die direkt mit dem Schädelknochen in Kontakt gekommen ist, aus einer 2,1%igen Gentamicinsulfat-Mischung (Gentamicinsulfat, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe). Des Weiteren wurde den Ratten über insgesamt acht Tage zweimal täglich Marbofloxacin (Marbocyl[®], Vétoquinol GmbH, Ravensburg) s.c. injiziert. Nach dem operativen Eingriff wurden die Wundränder um das Implantat durch Einzelhefte adaptiert. Zwischen der Operation und der BLA-Dauerstimulation erfolgte eine Rekonvaleszenzphase von sechs Wochen.

1.2.2. BLA-Dauerstimulation

Vor der 25-minütigen Stimulation der basolateralen Amygdala wurde zur Kontrolle bei jedem Tier das Elektroenzephalogramm (EEG) basal abgeleitet. Dafür wurde der Steckeraufsatz auf dem Kopf der Ratte über ein zweiadriges abgeschirmtes Kabel mit einer Aufzeichnungseinheit verbunden. Im Anschluss folgte die Dauerstimulation über die implantierte Stimulations- und Ableitungselektrode, um einen sich selbst-erhaltenden SE (SSSE) zu induzieren. Die Tiere wurden dafür mit der Stimulationsapparatur (Accupulser Modell A310C und Stimulus Isolator Modell A310C, World Precision Instruments, Berlin) verbunden. Anschließend wurden die Ratten über einen Zeitraum von 25 Minuten, einer Stromstärke von 700 μ A und einer Frequenz von 50 Hz mit Reizstrom elektrisch stimuliert. Pro Sekunde wurden bipolare Einzelimpulse (100 ms Dauer mit 1 ms dauernden, alterierend positiv-negativ geladenen Rechteckimpulsen) erzeugt. Nach der Dauerstimulation erfolgte wiederum die Ableitung des EEGs, um sicherzustellen, dass das Tier im SSSE ist. Nachfolgend wurde das Kabel vom Steckeraufsatz entfernt und die Ratten einzeln für 3 h 35 min in ein Glasaquarium gesetzt. Während der insgesamt vier Stunden wurde die Anfallsaktivität und –

schwere, sowie der SE-Typ erfasst, analysiert und protokolliert (Tab. 1). Nach der vierstündigen Beobachtungszeit wurde der SSSE mit einer intraperitonealen (i.p.) Diazepam-Injektion (10 mg/kg i.p.; Diazepam-ratiopharm[®], ratiopharm GmbH, Ulm) unterbrochen und per EEG überprüft, ob noch elektrographische Anfallsaktivität im Gehirn vorhanden war. Bei Bedarf wurde bis zur Anfallsunterbrechung Diazepam in gleicher Dosierung nachdosiert. Eine Zeitdauer des SSSE von vier Stunden ist erforderlich, um nachfolgend die Entwicklung spontaner epileptischer Anfälle zu gewährleisten (BRANDT et al. 2003). Um einer Dehydratation vorzubeugen wurde den Ratten bis zum zweiten Tag *post* SE Ringer-Lactat-Lösung (5 ml s.c. und 2,5 ml i.p.; Delta Select GmbH, Dreieich) appliziert. Die Kontrolltiere wurden analog zu den stimulierten Tieren in die Beobachtungskäfige gesetzt. Auch ihnen wurde sowohl Diazepam als auch Ringer-Lactat-Lösung injiziert.

1.2.3. Anfallsparameter

Die Anfallsstadien während der Beobachtungszeit der BLA-Dauerstimulation wurden anhand der Tabelle 1 nach BARAN et al. (1995) eingeteilt und protokolliert (BARAN et al. 1995). Auf Grundlage der Zuordnung der verschiedenen Anfallsstadien erfolgte die Zuordnung der Tiere zu den verschiedenen SSSE-Typen. Bei den Tieren, bei denen während der Stimulation ein SSSE ausgelöst wurde, wurden drei verschiedene Typen von SSSE unterschieden (BRANDT et al. 2003):

SSSE-Typ I: Anhaltende fokale Anfälle (Krampfstadium I- III)

SSSE-Typ II: Fokale Anfälle, die wiederholt von generalisierten Anfällen unterbrochen werden

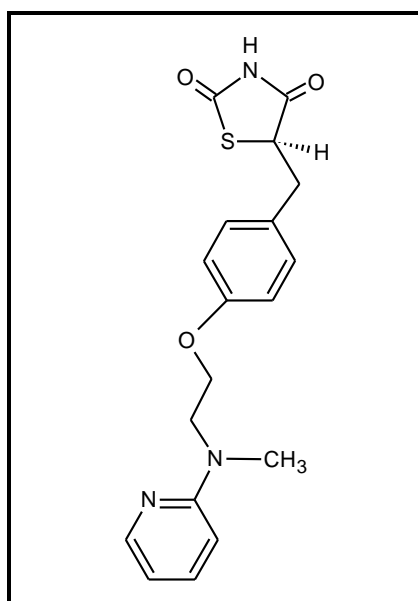
SSSE-Typ III: Anhaltende generalisierte Anfälle (Krampfstadium IV-V)

Krampfstadien	Charakteristika	
Stadium I	Immobilität, schwacher Fazialklonus (Schließen eines oder beider Augen, Zittern der Tasthaare, stereotypes Schnüffeln)	Fokale Anfallsaktivität
Stadium II	Kopfnicken, schwere Fazialklonien (klonische Kaubewegungen)	
Stadium III	Unilateraler Vorderextremitätenklonus	
Stadium IV	Aufrichten & bilateraler rudender Vorderextremitätenklonus	Generalisierte Anfallsaktivität
Stadium V	Aufrichten mit anschließendem Verlust der Stellreflexe nach hinten oder zur Seite überfallen, generalisierte klonische Krämpfe	
Stadium VI	Stadium V mit plötzlichem Rennen (<i>running</i>) und Springen (<i>bouncing</i>)	

Tab. 1 Einteilung der Krampfstadien (BARAN et al. 1995)

1.3. PPAR γ -Agonist Rosiglitazon

Der PPAR γ -Agonist Rosiglitazon wurde von der Cayman Chemical Company, USA hergestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Die Substanz lag als Kaliumsalz in einer über 98%igen Reinheit vor. Das Bindungsverhältnis zwischen Rosiglitazon (C₁₈H₁₉N₃O₃S; Molekulargewicht: 357,43 g/mol) und Kalium betrug 1:1.

Abb. 6 Strukturformel des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon

1.4. Bestimmung des Blutglukosespiegels

Rosiglitazon wurde therapeutisch zur Behandlung des Typ 2 *Diabetes mellitus* eingesetzt, um die Insulinsensitivität der Patienten zu erhöhen (WILLSON et al. 2001). Um den Effekt von Rosiglitazon auf den Blutglukosespiegel der Ratten zu untersuchen, wurde dieser vor Beginn und am Ende der Applikationsphase gemessen. Als Messgerät wurde GlucoMen®Lx PLUS⁺ (A. MENARINI diagnostics, Firenze, Italia) und die dazugehörigen Teststreifen GlucoMen®Lx sensor (A. MENARINI diagnostics, Firenze, Italia) benutzt. Das Blut zur Messung des Blutglukosespiegels wurde an der Schwanzvene des jeweiligen Tieres unter Isoflurannarkose (Isofluran CP®, cp-Pharma®, Burgdorf) entnommen.

1.5. Erfassung spontaner epileptischer Anfälle

Die Überwachung der Tiere zur Erfassung spontaner Anfallsaktivität begann in der zehnten Woche *post stimulationem*. Die Aufzeichnung epileptischer Anfälle erfolgte 24 Stunden pro Tag an 15 aufeinander folgenden Tagen mittels Elektroenzephalogramm (EEG)-Ableitung und Video-Monitoring.

1.5.1. EEG-Aufzeichnungen

Anhand der EEG-Daten wurden der exakte Zeitpunkt und die Dauer der Krampfaktivität gemessen. Die Signale von 20 Ratten wurden mit Hilfe von 20 Signalverstärkern (Animal Bio Amp, ADInstruments Ltd, Hastings, UK) und drei Analog-Digitalwandlern (Power Lab/800s, ADInstruments Ltd, Hastings, UK) synchron aufgezeichnet. Das EEG wurde mit einer Abtastrate von 200 Hz, mit einem *low pass filter* von 0,1 Hz und einem *high pass filter* von 60 Hz erstellt. Zur Filterung des Frequenzbereiches des Netzstroms von 50 Hz diente ein *Notch*-Filter. Die Kabel, die zur Ableitung der EEG-Signale verwendet wurden, wurden selbst angefertigt. Kommerziell waren keine passenden Kabel zu erwerben, die den Tieren genug Bewegungsfreiraum boten und zudem eine störungsfreie Ableitung sicherstellten. Hierbei handelte es sich um zweiadrige, abgeschirmte und ummantelte Kabel, die in einen Telefonverdrehler einmontiert wurden. Um das Grundrauschen zu minimieren, wurde die Kabelabschirmung mit Hilfe einer Krokodilklemme am Verstärker fixiert. Die Auswertung der abgeleiteten EEGs erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms LabChart7 (ADInstruments Ltd, Hastings, UK).

1.5.2. Video-Aufzeichnungen

Anhand der Video-Aufzeichnungen konnten die Anfälle in die verschiedenen Anfallstypen eingeteilt werden und die Anfallsdauer sowie der genaue Zeitpunkt des Anfalls überprüft werden (siehe IV.1.2.3).

Während der Erfassung spontaner Anfälle befanden sich die Tiere in Glasaquarien (Fläche: 33,5 cm x 79 cm; Höhe: 33,3 cm), die durch eine Trennwand zweigeteilt wurden. Somit konnten jeweils zwei Tieren pro Aquarium Platz gewährleistet werden. Die Aufzeichnung erfolgte über drei CCD-Schwarz-Weiß-Kameras (Conrad Electronic GmbH, Hannover) und eine Farbkamera (Conrad Electronic GmbH, Hannover). Alle Kameras enthielten interne Infrarot-Strahler sowie einen Lichtsensor. Dies ermöglichte Aufnahmen während der Dunkelphase. Die Kameras waren mit einem Computer verbunden, der die Daten auf eine RAID (*Redundant Array of Independent Discs*) speicherte. Aufgrund technischer Probleme musste ab der zweiten Woche des Monitorings auf eine externe Festplatte (Conrad Electronics SE, Hirschau) gespeichert werden. Die gesamte Zeitdauer der Erfassung spontaner Anfälle betrug 10 Tage und 5 Stunden.

1.6. Verhaltensuntersuchungen

Die Tiere wurden einen Tag vor dem Beginn der Verhaltensuntersuchungen anhand des *Irwin Score* (Kapitel X.1) beurteilt, um Auffälligkeiten im Verhalten der Tiere zu erfassen. Es konnten keine Verhaltensauffälligkeiten festgestellt werden.

Die Verhaltensuntersuchungen fanden in einem eigens dafür vorgesehenen, schallisolierten Raum statt. Die Tests wurden im mittleren Bereich des Verhaltensraumes durchgeführt. Dieses Areal (291 cm x 294 cm) wurde von allen vier Seiten durch bodenlange, schwarze, blickdichte Vorhänge, die an einem metallenen Gestell befestigt waren, begrenzt. Als Unterlage diente ein schwarzer Teppich. Dadurch erschien die Umgebung gleichmäßig schwarz. Während des *Morris Water Maze* (MWM) wurde der Teppich entfernt, um ihn weder durch die große Testapparatur noch durch das verwendete Wasser zu beschädigen. Die verschiedenen Apparaturen wurden direkt in die Mitte des von den Vorhängen abgegrenzten Bereiches gestellt. Direkt darüber befand sich eine Kamera (CCTV Camera, Modell-Nr. WV-BP330/OE, Panasonic System Solutions Suzhou Co. Ltd., Suzhou, China), die den ganzen Versuch aufzeichnete. Diese war mit einem

Computer, der sich im Nebenraum befand, verbunden. Die Auswertung der Daten erfolgt durch das Programm EthovisionXT 8.5 (Noldus, Wageningen, Niederlande). Zur Einstellung der jeweiligen Lichtintensität wurde ein Luxmeter (Lightmeter MS-1300, Voltcraft®, Conrad Electronic SE, Hirschau) benutzt. Nach jedem Durchgang wurde die jeweilige Apparatur von Fäkalien gereinigt. Des Weiteren wurden sie mit 0,1% iger Essigsäure gesäubert, um die Duftmarken des vorherigen Tieres zu entfernen.

Die verschiedenen Verhaltensuntersuchungen wurden in der nachfolgenden Reihenfolge durchgeführt.

1.6.1. Open Field

Das *Open Field* (OF) diente als Verhaltenstest zur Untersuchung der Lokomotion, Exploration und des angstassoziierten Verhaltens. Das OF bestand aus einer runden, schwarzen Kunststoffapparatur. Diese hatte einen Durchmesser von 115 cm und war von einer 25 cm hohen Wand umgeben. Da zwei identische Versuchsaapparaturen aufgebaut wurden, war es möglich immer zwei Tiere gleichzeitig zu untersuchen. Die Lichtintensität wurde durch die Verwendung von zwei 80 Watt Lampen (Philips Lighting, Eindhoven, Niederlande) auf 10-20 Lux eingestellt. Die Lampen wurden mittig über dem OF angebracht. Jeder Durchgang dauerte 15 min. Zu Beginn des Tests wurde das jeweilige Tier einzeln mit derselben Blickrichtung in das OF gesetzt. Das Computerprogramm unterteilte die Arena in drei Segmente: einer äußeren, einer mittleren und einer inneren Zone. Dabei wurde darauf geachtet, dass die äußere und die innere Zone die gleiche Grundfläche besaßen. Während des Versuchs wurde die zurückgelegte Wegstrecke, die Laufgeschwindigkeit, die *rearings* (= Aufrichten der Ratten um mehr als 45°) sowie die jeweilige Aufenthaltsdauer in der äußeren und inneren Zone gemessen.

1.6.2. Black White Box

Die *Black White Box* (BWB) diente der Untersuchung des angstassoziierten Verhaltens. Die Box bestand aus einem weißen, nach oben offenen Kompartiment (Grundfläche: 39 cm x 39 cm) sowie einem schwarzen, geschlossenen Kompartiment (Grundfläche: 39 cm x 20 cm). Beide Hälften waren durch einen Durchgang von 10 cm x 10 cm miteinander verbunden. Die Wandhöhe der

Apparatur betrug 39 cm. Die BWB befand sich auf einem 80 cm hohen Tisch. Um die Lichtintensität von 50 Lux in dem weißen Kompartiment sicherzustellen, wurden vier 60 Watt Lampen (240 Volt, Osram Concentra, Frankreich) direkt über der Box ausgerichtet. Zu Beginn jedes Durchgangs wurden die Ratten einzeln mit Blickrichtung zum Durchgang in das weiße Kompartiment gesetzt. Während einer Zeitdauer von 5 min wurde die Aufenthaltsdauer im jeweiligen Teil der BWB, die Latenzzeit bis zum ersten Übertritt in das schwarze Kompartiment sowie die Anzahl der Übertritte zwischen beiden Bereichen der BWB gemessen. Des Weiteren wurde die Anzahl der *stretching postures* (= mit gestreckten Oberkörper in den weißen Teil hineinschauen, während die Hinterfüße im schwarzen Teil verbleiben) erfasst. Dies diente als Indikator für die Risikobereitschaft der Tiere in das weiße Kompartiment zu wechseln.

1.6.3. Elevated Plus Maze

Auch das *Elevated Plus Maze* (EPM) diente zur Untersuchung des angstassoziierten Verhaltens. Die Kunststoffapparatur bestand aus vier Armen, die jeweils im rechten Winkel zueinander angeordnet waren und somit die Form eines Kreuzes einnahmen. Zwei sich gegenüberliegende Arme waren durch 28,5 cm hohe Begrenzungswände seitlich begrenzt. Die anderen zwei Arme hatten keine Begrenzungswände und waren somit seitlich offen. Die Fläche jedes einzelnen Armes betrug 50 cm x 14 cm und das Zentrum zwischen den einzelnen Armen 14 cm x 14 cm. Das EPM befand sich auf einem 82 cm hohen Gestell. Alle vier 60 Watt Lampen (240 Volt, Osram Concentra, Frankreich) wurden über dem EPM so ausgerichtet, dass die Lichtintensität in den geschlossenen Armen 10 Lux und auf den offenen Armen 20 Lux erreichte. Die kreuzförmige Fläche des EPM wurde anhand des Computerprogramms in das Zentrum und die jeweiligen Arme unterteilt. Bei den offenen Armen wurde das äußere Drittel zusätzlich in einen Bereich unterteilt. Zu Beginn jedes Durchgangs wurden die Tiere jeweils einzeln mit derselben Blickrichtung in das Zentrum gesetzt und anschließend für eine Zeitdauer von 5 min untersucht. Dabei wurde die Laufgeschwindigkeit, die Aufenthaltsdauer in den einzelnen Bereichen, die zurückgelegte Strecke, sowie die Anzahl der *head dips* (= von den offenen Armen auf den Fußboden schauen) und der *stretching postures* (= mit gestreckten Oberkörper auf den offenen Arm schauen, während die Hinterfüße im geschlossenen Arm verbleiben) gemessen.

Die *head dips* und die *stretching postures* dienten als Indikator der Risikobereitschaft der Tiere.

1.6.4. Morris Water Maze

Bei diesem Lern- und Gedächtnistest sollen die Ratten lernen eine sich unter der Wasseroberfläche befindlichen Plattform aufzufinden. Das *Morris Water Maze* (MWM) bestand aus einem 60 cm tiefen Kunststoffbecken mit einem Durchmesser von 145 cm. Der Wasserspiegel befand sich ca. 2 cm über der Plattform (Fläche: 10 cm x 15 cm, Höhe: 26 cm). Als Orientierungshilfe wurden diverse Merkmale (Kreis, Dreieck, Quadrat) in sichtbarer Höhe auf den umgebenden Vorhängen angebracht. Die Fläche des Wasserbeckens wurde in vier Quadranten unterteilt. Die Wassertemperatur betrug während des Versuches 19 bis 22°C. Das Wasser wurde alle 2 Tage ausgetauscht. Die Lichtintensität wurde mit vier 60 Watt Lampen (240 Volt, Osram Concentra, Frankreich) und acht Halogen-Kaltlichtreflektoren (50 Watt, 230 Volt, Karat, Kleve) auf 60 Lux eingestellt. Der Versuchsablauf lässt sich in drei Phasen unterteilen: 1.) die Habituationsphase, 2.) die Akquisitionsphase (*spatial learning*) und 3.) der Extinktionsdurchgang (*spatial probe*). Zu Beginn des Tests fand ein Habitationsdurchgang (Tag 0) statt, um die Tiere an die Umgebung und das Wasser zu gewöhnen. Dabei wurde untersucht, ob Unterschiede bezüglich der Schwimmgeschwindigkeit zwischen den verschiedenen Tiergruppen festzustellen waren. An den nachfolgenden Tagen erfolgte die Akquisitionsphase (Tag 1-6) mit jeweils vier Durchgängen. Bei jedem Durchgang wurde der Quadrant des MWM, in den die Ratten gesetzt wurden, gewechselt. Es wurde darauf geachtet, dass die Tiere mit Blickrichtung zur Mitte des Beckens in das Wasser gesetzt wurden. Der Versuchsdurchgang stoppte entweder nach Auffinden der Plattform oder nach 60 Sekunden bei Nichtauffinden. Jedes Tier, welches die Plattform nicht gefunden hatte, wurde im Anschluss an den Durchgang für zehn Sekunden auf die Plattform gesetzt. Danach wurden die Tiere mit einem Handtuch abgetrocknet und in einen durch eine Rotlichtlampe (150 Watt, 240 Volt, Eurofarm GmbH, Bützberg, Schweiz) beheizten, großen Makrolonkäfig gesetzt. Im Anschluss an den letzten Akquisitionsdurchgang fand die *spatial probe* statt. Hierzu wurde die Plattform entfernt. Um das Erinnerungsvermögen an den ehemaligen Standort der Plattform zu untersuchen, wurden die Tiere für eine Zeitdauer von 60 Sekunden für

wiederum vier Durchgänge in das MWM gesetzt.

Während der Habituationsphase wurden die zurückgelegte Strecke (cm) und die Durchschnittsgeschwindigkeit (cm/s) gemessen und ausgewertet. Während dem *spatial learning* und der *spatial probe* wurde die Latenzzeit bis zum Auffinden der Plattform (s), die Dauer der Aufenthalte in den verschiedenen Quadranten (s), die Durchschnittsgeschwindigkeit (cm/s) und speziell bei der *spatial probe* die Kreuzungen der früheren Plattformposition gemessen.

1.7. Histologische Gewebeaufbereitung

1.7.1. Transkardiale Perfusion

Vor der transkardialen Perfusionsfixierung wurden die Ratten mit Pentobarbital (500 mg/kg i.p.; Narcoren®, Merial GmbH, Hallbergmoos) euthanasiert. Anschließend wurde die Ratte in Rückenlage fixiert, Abdomen und Thorax eröffnet und eine Knopfkanüle in die linke Herzkammer positioniert. Um den Abfluss des Blutes zu gewährleisten, wurde das rechte Herzohr eröffnet und dann zuerst mit einer 0.01 M phosphatgepufferten 0,9%igen Kochsalzlösung (pH 7,6) das Blut aus dem Blutkreislauf ausgespült. Anschließend wurde dann das Gewebe 20 min mit einer 4°C kalten Mischung aus 8%iger Paraformaldehydlösung und 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4) fixiert. Nach der Perfusion wurde das Gehirn entnommen und für einen Tag in 4%iger Paraformaldehyd gelagert. Anschließend wurden die Gehirne in einer Mischung aus 30%iger Saccharose-Lösung und 0,1 M Phosphatpuffer mindestens drei Tage aufbewahrt, um den nötigen Gefrierschutz herzustellen.

1.7.2. Herstellung der Gefrierschnitte

Die Gefrierschnitte wurden nach Sättigung der perfusionsfixierten Gehirne mit der Gefrierschutzlösung an einem Schlittenmikrotom (Modell 1205, Fa. Reichert-Jung, Wetzlar) unter Hilfe einer Kühlvorrichtung (Frigomobil, Fa. Reichert-Jung, Wetzlar) angefertigt. Dazu wurde das Gehirn auf dem Blockträger unter Verwendung von Einbettmedium für Gefrierschnitte (Jung Tissue Freezing Medium®, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch) aufgefroren und in sechs Serien mit einer Dicke von 40 µm bei einer Objekttemperatur von -30°C geschnitten. Die frischen Gehirnschnitte wurden in 0,1 M Phosphatpuffer zwischengelagert, bis sie anschließend in das Gefriermedium überführt und für

24 Stunden in einem -20°C Kühlschrank zwischengelagert wurden. Danach wurden sie bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

1.8. Immunhistochemische und histologische Färbemethoden

Die Anwendung immunhistochemischer und histologischer Färbemethoden erfolgte zur Veranschaulichung anfallsinduzierter Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene. Mit Ausnahme der Nissl-Färbung wurden alle Färbemethoden im *free-floating*-Verfahren durchgeführt. Die exakten Färbeprotokolle sind im Anhang (Kapitel X.3) aufgeführt. Eine Übersicht über die bei den immunhistochemischen Färbemethoden verwendeten Antikörper ist der nachfolgenden Tabelle (Tab. 2) zu entnehmen.

Färbung	Primärer Antikörper	Hersteller	Sekundärer Antikörper	Hersteller
Interleukin-1 beta	Polyklonaler Kaninchen-anti-Il-1 beta	Abcam, Cambridge, UK	Polyklonaler biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen	Dako, Glostrup, Dänemark
BrdU	Monoklonaler Ratte-anti-BrdU	AbD Serotec, Kidlington, UK	Cy3-konjugierter Esel-anti-Ratte	Jackson Immuno Research, Westgrove, USA
NeuN	Monoklonaler Maus-anti-NeuN	Merck Millipore, Billerica, USA	Polyklonaler biotinylierter Esel-anti-Maus	Jackson Immuno Research, Westgrove, USA
ED 1	Monoklonaler Maus-anti-CD68	AbD Serotec, Kidlington, UK	Polyklonaler biotinylierter Kaninchen-anti-Maus	Dako, Glostrup, Dänemark

Tab. 2 Übersicht über die verwendeten Antikörper

1.8.1. Nissl-Färbung

Die histologische Nissl-Färbung wurde an der ersten Serie der Gehirnschnitte durchgeführt. Mit Hilfe dieser Färbung lassen sich Neurone von Gliazellen differenzieren. Durch den basischen Farbstoff Thionin werden insbesondere Nissl-Schollen (Stapel endoplasmatischen Retikulums) angefärbt. Diese Nissl-Schollen sind vor allem im Zellkörper von Neuronen zu finden. Anhand der Thionin-gefärbten Schnitte wurden nicht nur neurodegenerative Veränderungen analysiert, sondern auch die exakte Positionierung der Ableitungs- und

Stimulationselektrode überprüft. Die Gehirnschnitte wurden unter der Verwendung von Chrom-Gelatine auf die Objektträger aufgezogen und anschließend luftgetrocknet. Zuerst erfolgte die Fixierung der Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe. Im Anschluss wurden die Gehirnschnitte mit dem Farbstoff Thionin gefärbt und der überschüssige Farbstoff in einer aufsteigenden Alkoholreihe abgewaschen.

1.8.2. Interleukin-1 beta

Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-1 beta (IL-1 β) wurde unter Verwendung der zweiten Serie durch eine immunhistochemische Färbetechnik nachgewiesen. Dieses Zytokin fungiert als wichtiger Entzündungsmediator. Die hier verwendete Färbetechnik basiert auf der LSAB (*Labelled Streptavidin-Biotin*)-Methode. Dabei bindet der biotinmarkierte (= biotinylierte) Sekundärantikörper an den unkonjugierten Primärantikörper. Streptavidin, welches wiederum direkt an das Enzym Peroxidase gekoppelt ist, bindet an das Biotin. Die Sichtbarmachung der Immunreaktion erfolgt dann durch die Umsetzung eines Chromogensubstrates durch die Peroxidase.

Nach dem Waschen wurden die mit Paraformaldehyd fixierten Schnitte durch Natriumcitrat bei 80°C hitzedemaskiert. Um die endogene Peroxidase zu blockieren, erfolgte anschließend eine Behandlung des Gewebes mit einer Wasserstoffperoxid (H₂O₂)-Lösung. Durch die darauffolgende Inkubation mit der *Blocking*-Lösung wurden unspezifische Bindungen des Primärantikörpers verhindert, indem die elektrostatischen Ladungen des Gewebes gesättigt wurden. Direkt im Anschluss erfolgte die Behandlung mit dem unkonjugierten Primärantikörper in einer *Carrier*-Lösung. Am nächsten Tag wurden die Gehirnschnitte mit dem biotinylierten sekundären Antikörper in einer *Carrier*-Lösung inkubiert. Nachfolgend wurde Streptavidin-Meerrettichperoxidase zugegeben, um an das Biotin des sekundären Antikörpers zu binden. Die Sichtbarmachung der Immunreaktion erfolgte im Anschluss durch die Zugabe von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA).

1.8.3. BrdU/NeuN

Zur Bestimmung SE-induzierter neuronaler Zellproliferation diente der immunhistochemische Nachweis der in der DNA eingebauten Bromdesoxyuridinsäure (BrdU) sowie aller Nervenzellen. Das BrdU (5-Bromo-

2'-deoxy-Uridine, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurde den Tieren an Tag 5-9 nach dem SE appliziert. Dieser Proliferationsmarker baut sich in die DNA neugebildeter Zellen anstelle von Thymidin ein. Durch den immunhistochemischen Nachweis des Neuronen-spezifischen Proteins NeuN wurden alle vorhandenen Nervenzellen markiert. Die BrdU/NeuN-doppelmarkierten Zellen zeigen die Neurone auf, die zum Zeitpunkt der BrdU-Applikation neugebildet wurden.

Nach dem Waschen wurden die Gehirnschnitte der dritten Serie bei 65°C zwei Stunden in einer Formamid/SSC-Mischung denaturiert. Ebenfalls zur Denaturierung wurden die Schnitte danach sowohl mit Salzsäure als auch Borsäure behandelt. Die Hitzedenaturierung und Säurebehandlung ist notwendig, damit der BrdU-Antikörper an das BrdU binden kann. Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu verhindern, erfolgte auch bei dieser Färbemethode die Inkubation mit einer *Blocking*-Lösung. Die Schnitte wurden dann mit den beiden primären Antikörpern in einer *Carrier*-Lösung über Nacht behandelt. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Inkubation der Gehirnschnitte mit einem Farbstoff-markierten sekundären Antikörper und einem biotinylierten sekundären Antikörper in einer *Carrier*-Lösung. Der Farbstoff-markierte Antikörper bindet an den BrdU-Antikörper, wohingegen der biotinylierte Antikörper an den NeuN-Antikörper bindet. Die NeuN-Immunreaktion wurde durch die Zugabe des Farbstoff-gekoppelten Streptavidin sichtbar gemacht.

1.8.4. ED1

Zur Quantifizierung der Mikrogliaaktivierung wurde der Marker ED1 (AbD Serotec, Kidlington, UK) verwendet. Nach dem Waschen der Gehirnschnitte der vierten Serie erfolgte die Demaskierung mit Hilfe von Natriumcitrat (pH-Wert 9) bei 80°C. Im Anschluss daran folgte die Blockierung der endogenen Peroxidase mittels einer Wasserstoffperoxidlösung. Nach der Inkubation mit der *Blocking*-Lösung wurden die Gehirnschnitte für circa 12 Stunden in das primäre Antiserum verbracht. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Behandlung der Schnitte mit dem biotinmarkierten sekundären Antikörper. Vor der Sichtbarmachung der Immunreaktion mit Hilfe von 3,3'-Diaminobenzidin wurden die Schnitte mit der Streptavidin-Meerrettichperoxidase inkubiert.

1.9. Auswertung und Statistik

Die Auswertungen der immunhistochemischen und histologischen Färbungen erfolgten verblindet. Die Schnittebenen wurden auf der Grundlage von PAXINOS u. WATSON (2005) definiert.

Analyse der Neurodegeneration und Mikrogliaaktivierung

Die Analyse der Neurodegeneration erfolgte anhand Nissl-gefärbter Gehirnschnitte mit Hilfe eines Score-Systems. Dabei wurden sowohl die CA₁-, CA₂-, CA_{3a}- und CA_{3c/4}-Region des Ammonshorn (*Cornu ammonis*, CA) sowie der parietale Cortex und der piriforme Cortex ausgewertet.

Score-Wert	Definition
0	Keine erkennlichen Läsionen
1	<20% Neurodegeneration
2	20-50% Neurodegeneration
3	>50% Neurodegeneration

Tab. 3 Score-System zur Beurteilung des Schweregrades der Neurodegeneration anhand der Nissl-Färbung (modifiziert nach BRANDT et al. (2003)).

Auch zur Analyse der aktivierten Mikroglia wurden die ED1-markierten Gehirnschnitte mit Hilfe eines Score-Systems ausgewertet. Hierbei wurden Score-Werte von 0 bis 3 verwendet. Es wurden der piriforme Cortex, CA₁-, CA₂-, CA_{3a}- und CA_{3c/4}-Region, der *Gyrus dentatus* sowie der Hilus untersucht.

Quantifizierung BrdU/NeuN-positiver Zellen

Mit Hilfe des konfokalen Mikroskops (LSM 510, Carl Zeiss GmbH, Göttingen) erfolgte die Auswertung der BrdU-markierten sowie der BrdU/NeuN-doppelmarkierten Zellen bei 40-facher Vergrößerung. Der *Gyrus dentatus* wurde bei jedem Tier anhand von sechs Gehirnschnitten untersucht.

Bestimmung der Menge von Interleukin-1 beta (IL-1 β) sowie der Anzahl thioningefärbter Neurone mit Hilfe der „optical fractionator“-Methode

Die Quantifizierung der Menge des inflammatorischen Zytokines IL-1 β sowie der Thionin-gefärbten Neurone wurden mit Hilfe einer stereologischen Zählmethode,

der sogenannten *optical fractionator*-Methode durchgeführt (WEST et al. 1991). Das hierfür verwendete System bestand aus einem Mikroskop (Leica DM LB-Mikroskop, Leica, Bensheim), einer Plan-Neoflunar Linse (Leica, Bensheim), einer digitalen Farbkamera (*single chip charge coupled device*, CCD, CX9000, Microbrightfield Europe, Magdeburg), einem Computer und der computergestützten Bildanalysesoftware StereoInvestigator6.0 (Microbrightfield Europe, Magdeburg). Bei dieser Methode kann die Zählung unbeeinflusst von Form, Größe und Orientierung des Zytokins oder der Zellen im dreidimensionalen Raum (*optical disector*) erfolgen. Es konnte somit nicht nur die absolute Anzahl an freigesetzten Zytokinen oder Neuronen ausgewertet werden, sondern auch die relative Anzahl bezogen auf das Volumen des zu untersuchenden Gewebes. Pro Tier wurde anhand von sechs Gehirnschnitten beidseits der Bereich des Hilus ausgezählt. In jedem auszuzählenden Bereich wurden zehn sogenannte *optical disectors* ausgewertet.

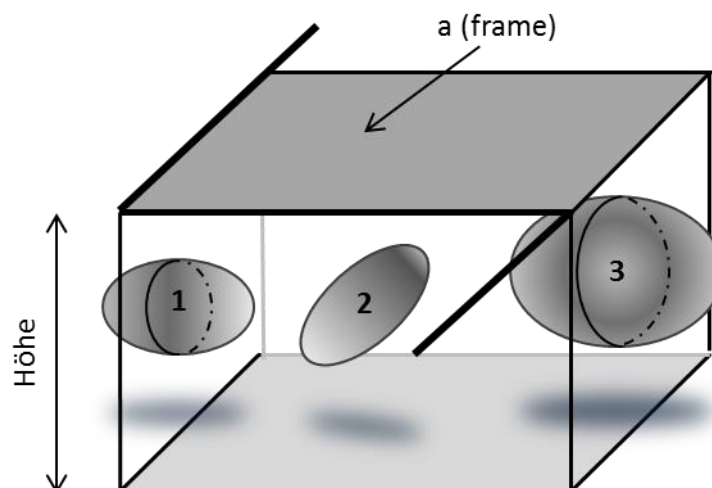


Abb. 7 Darstellung des *optical disectors*. Der Bereich *a (frame)* ($60 \times 60 \mu\text{m}$) stellt die Oberfläche des dreidimensionalen Raumes dar. Zellen, die in diesem Bereich liegen, werden gewertet. So wird Zelle 1 nicht gewertet, da sie die *exclusion line* berührt. Zelle 2 liegt vollständig im *frame* und wird gezählt. Zelle 3 liegt zwar nicht vollständig im Kubus, da sie jedoch keine *exclusion line* berührt, wird sie gezählt (modifiziert nach KEUKER et al. (2001)).

Statistik

Für die statistischen Analysen wurde das Computerprogramm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) für Windows verwendet. Die Daten wurden als Mittelwert \pm SEM (*standard error of the mean*, Mittelwertsfehler, Standardfehler) angezeigt. Als Signifikanzwert (p-Wert) wurde $p < 0,05$ festgelegt.

Die Analyse erfolgte bei normalverteilten Daten unter Verwendung der *1-way ANOVA*. Zur Analyse von zwei zu vergleichender Stichproben parametrischer Daten wurde der ungepaarte *Student's t-test* verwendet. Nichtparametrische Daten zweier Stichproben wurden durch den *Student's t-test* auf Signifikanz geprüft. Bei mehr als zwei Stichproben wurde zuvor mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests getestet. Die statistischen Analysen der Nissl-Färbung wurden einseitig ausgeführt. Die anderen Daten wurden zweiseitig getestet.

1.10. Versuchsdesign

Nach der Implantation einer teflonisolierten bipolaren Edelstahlelektrode in die rechte basolaterale Amygdala erfolgte die Aufteilung der 60 Ratten in vier Gruppen. Zwei der Gruppen bestanden aus elektrodenimplantierten Kontrolltieren, bei denen kein SE ausgelöst wurde. Einer Gruppe wurde die Vehikellösung und der anderen Rosiglitazon (3 mg/kg in 3 ml Aqua ad inj.) i.p. appliziert. Die beiden übrigen Gruppen bestanden aus elektrodenimplantierten Tieren, bei denen ein SE ausgelöst wurde. Wiederum einer Gruppe wurde die Vehikellösung und der anderen Gruppe Rosiglitazon (3 mg/kg in 3 ml Aqua ad inj.) i.p. verabreicht. Als Vehikellösung wurde Aqua ad inj. (AlleMan Pharma GmbH, Rimbach) verwendet. Aufgrund von Verlusten des Implantats vor dem SE mussten 18 Ratten vom weiteren Studienverlauf ausgeschlossen werden. Ein Tier verstarb vor dem SE.

Im Anschluss an die Implantation der Elektrode erfolgte eine sechswöchige Rekonvaleszenzphase. Nach diesen sechs Wochen erfolgte die elektrische Stimulation der basolateralen Amygdala. Dabei wurde ein sich selbst-erhaltender *Status epilepticus* (SSSE) ausgelöst, der nach vier Stunden durch die Applikation von Diazepam (10 mg/kg i.p.; Diazepam-ratiopharm®, ratiopharm GmbH, Ulm) unterbrochen wurde. Tiere, die einen SSSE-Typ 0 oder I hatten, wurden von weiteren Versuchen ausgeschlossen. Fünf Tiere starben durch oder in Folge des SSSE. Direkt nach der Diazepam-Gabe wurde auch erstmals die Vehikellösung bzw. Rosiglitazon i.p. appliziert. Diese Behandlung wurde von nun an weiteren 27 Tagen einmal täglich i.p. fortgesetzt. An den Tagen 5-9 der Applikationsphase wurde den Tieren Bromdesoxyuridinsäure (5-Bromo-2'-deoxy-Uridine, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zweimal täglich i.p. injiziert.

Neun Wochen nach der Dauerstimulation erfolgte ein zweiwöchiges Monitoring

der Ratten. Dies diente der Analyse spontaner epileptischer Anfälle mit Hilfe von Kameras und Elektroenzephalographen (EEG). Zwei Tiere wurden während der Video- und EEG-Überwachung aufgrund von schlechtem Allgemeinbefinden von weiteren Versuchen ausgeschlossen.

Direkt im Anschluss an die Überwachung wurden bei den Ratten verschiedene Verhaltensuntersuchungen (*Morris Water Maze*, *Black White Box*, *Elevated Plus Maze* und *Open Field*) durchgeführt. Während der Verhaltenstests verloren zwei Tiere ihr Implantat und wurden aufgrund dessen von den Verhaltensuntersuchungen und weiterführenden Untersuchungen ausgeschlossen.

Nach diesen Tests erfolgte die Tötung und Perfusionsfixierung der Tiere. Nachfolgend wurden die fixierten Gehirne entnommen, von ihnen Gehirnschnitte angefertigt und anschließend immunhistochemisch untersucht. Aufgrund der geringen Tierzahl der Kontrollgruppen wurden bei drei weiteren Sham-Tieren einer zweiten Charge die Versuche durchgeführt. Es wurden folgende Färbungen durchgeführt: 1.) Nissl-Färbung, 2.) IL-1 β , 3.) BrdU/NeuN, 4.) ED1. Die mit IL-1 β gefärbten Schnitte wurden von Tanja Ongerth ausgewertet. Die Quantifizierung BrdU-markierter und die BrdU/NeuN-doppeltmarkierter Zellen führte von Andreas Blaschke durch.

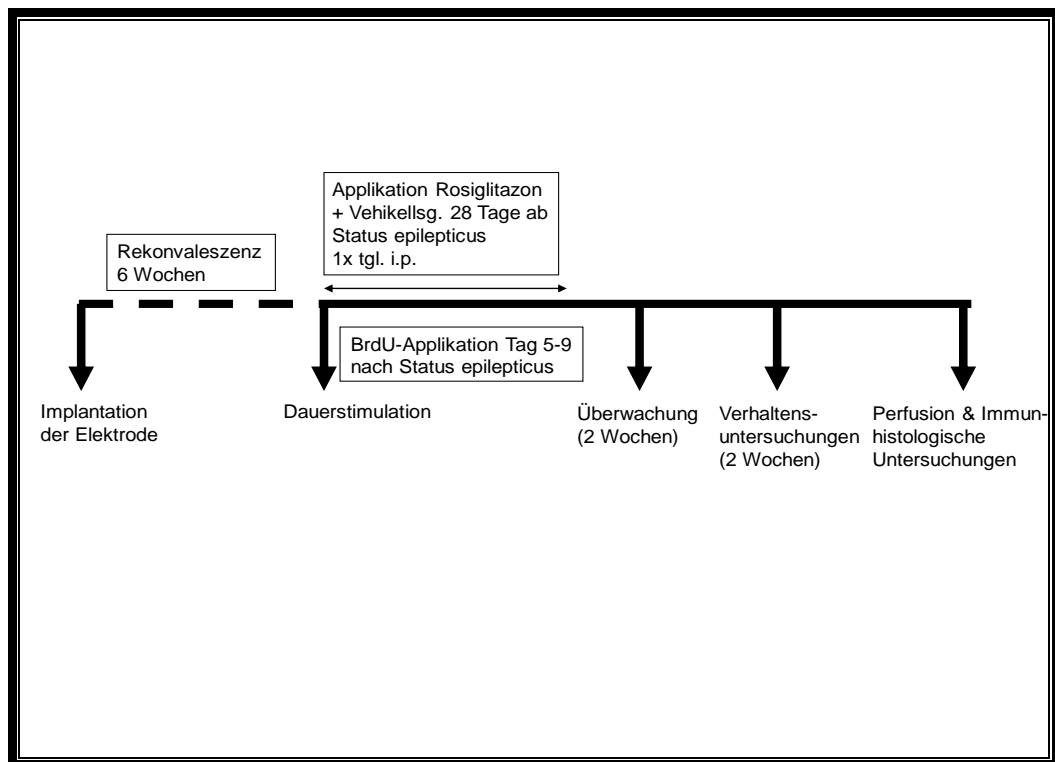


Abb.8 Versuchsdesign und zeitlicher Verlauf des Post-Status epilepticus-Modells

Gruppe 1	Sham / Vehikel (n=15)
Gruppe 2	Sham / Rosiglitazon (n=14)
Gruppe 3	SE / Vehikellösung (n=17)
Gruppe 4	SE / Rosiglitazon (n=17)

Tab. 4 Einteilung der Gruppen

2. Prüfung des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon im Amygdala-Kindling-Modell der Temporallappenepilepsie

2.1. Versuchstiere

Diese Studie wurde von der Regierung Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen: 55.2-1-54-2532-173). Als Versuchstiere wurden 42 männliche HsdWin:NMRI Mäuse (Harlan Winkelmann, Niederlande) mit einem Anfangsgewicht von 31-35 g verwendet. Die Tierhaltung erfolgte analog zur der bereits beschriebenen

Haltung in Kapitel IV.1.1. unter Verwendung von Makrolonkäfigen Typ 2. Nach einer 11-tägigen Eingewöhnungszeit wurde mit den Versuchen begonnen. Um sicherzugehen, dass die circadianen Einflüsse möglichst gering sind, erfolgte der Versuchsbeginn immer zwischen 7.00 und 9.00 Uhr MEZ (STEWART et al. 2001). Der Versuchsablauf fand in zwei Chargen mit einem zeitlichen Abstand von zwei Wochen statt.

2.2. Amygdala-Kindling-Modell

2.2.1. Implantation der Elektrode

Die Implantation der Ableitungs- und Stimulationselektrode erfolgte analog zu dem Kapitel IV.1.2.1. mit folgenden Unterschieden: Die Oberkieferhalterung wurde auf 0,0 mm der Intraaurallinie eingestellt und die Koordinaten betrugen anterior posterior (ap) + 1,0; lateral (lat) + 3,2 und dorsoventral (dv) + 5,3. Diese wurden zum Bregma addiert, um dort die Elektrode zu platzieren. Meloxicam wurde mit einer Dosierung von 1 mg/kg (Metacam®, Boehringer Ingelheim, Ingelheim/Rhein; 1:50 Verdünnung mit Aqua ad inj.) s.c. verabreicht. Zur Narkose wurde Chloralhydrat (400 mg/kg in 10 ml/kg 0,9%iger NaCl-Lösung; Merck, Darmstadt) i.p. appliziert. Das Lokalanästhetikum Bupivacain 0,5% (Jenapharm®, mibe GmbH, Brehna) wurde s.c. in den zu eröffnenden Hautbereich injiziert. Des Weiteren wurde den Tieren keine Antibiose verabreicht, da sich der Operationsbereich bei Mäusen sehr selten entzündet. Auch der kaltpolymerisierende Kunststoff (Paladur®, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau), welcher der Stabilisierung dient, wurde nicht mit einem Antibiotikum gemischt.

2.2.2. Kindling

Nach einer zweiwöchigen Rekonvaleszenzphase begann das *Kindling* der Mäuse. Die Tiere wurden dazu über den Steckeraufsatz ihrer Ableitungs- und Stimulationselektrode mit einem dreipoligen, abgeschirmten, ummantelten Kabel verbunden. Dieses war wiederum an eine Stimulatoreinheit (Stimulator I Type 215E/1, Hugo Sachs Elektronik, March, Germany) angeschlossen. Die zwischengeschaltete *Switchbox* ermöglichte eine kontinuierliche Ableitung des EEGs. Die Aufzeichnung des EEGs konnte mit Hilfe des Computers und der *Software* LabChart7 (ADInstruments Ltd, Hastings, UK) sichergestellt werden. Der Stimulationsstrom bestand aus monophasischen Rechteckimpulsen mit einer

Dauer von einer Millisekunde und einer Frequenz von 50 Hz für eine Gesamtdauer von einer Sekunde. Die Mäuse wurden zur Stimulation in einen Glaskasten gesetzt. Ein dahinter befindlicher Spiegel erleichterte die Beobachtung des Krampfanfalls. Die Klassifizierung der Krampfsschwere (*seizure severity*, SS) erfolgte nach der Tabelle 1. Die Krampfdauer (*seizure duration*, SD) jedes einzelnen Tieres wurde aufgezeichnet. Hierbei wurde zwischen der Dauer der motorischen Aktivität (= SD1) und der gesamten Zeitdauer, vom Stimulationsbeginn inklusive der postiktalen Phase (= SD2) unterschieden. Anhand der digitalen EEGs der Mäuse wurde die Nachentladungsdauer (*after discharge duration*, ADD) erfasst. Unter der Nachentladungsdauer versteht man die Zeit, in der nach dem Stimulationsbeginn im EEG Spikes mit einer Frequenz von mindestens 1 Hz und einer Amplitude mit mindestens doppelter Höhe der Grundlinie zu erkennen sind. Die ADD1 (= Dauer der auftretenden *Spikes*) und die ADD2 (= ADD1 inklusive *Spikes* mit einem im Vergleich zu den *Spikes* in ADD1 veränderten Muster) wurden protokolliert. Hierbei wurden Unterbrechungen im *Spike*-Muster von bis zu drei Sekunden vernachlässigt. Ein Krampfanfall, der nur im EEG zu erkennen war, wurde als Krampfstadium „0“ bezeichnet, da ein Nachentladungsmuster auch ohne motorische Aktivität einhergehen kann (SATO et al. 1990). Implantierte Kontrolltiere wurden nicht stimuliert, jedoch analog zu den anderen Tieren mit dem Kabel verbunden und in den Glaskasten gesetzt.

Bestimmung der initialen Nachentladungsschwelle

Zu Beginn des *Kindling*-Prozesses wurde die initiale Nachentladungsschwelle (*after discharge threshold*, ADT) für jedes Tier individuell bestimmt. Zu Beginn erfolgte die Stimulation mit einer Reizstromstärke von 8 μ A. Die Stimulationsstärke wurde nachfolgend im Abstand von je einer Minute um je 20 Prozent bis maximal 1000 μ A stufenweise erhöht. Bei Auslösung elektrographischer Anfallsaktivität wurde gestoppt. Die Stimulationen wurden mit einer Dauer von jeweils einer Sekunde durchgeführt. Anschließend wurde die Krampfschwere, die SD1, SD2, ADD1 und ADD2 protokolliert.

Aufkindeln

Im Anschluss an die Bestimmung der initialen ADT wurden die Tiere einmal

täglich an Wochentagen mit einer Reizstromstärke von 700 μ A stimuliert. Dies wurde solange fortgesetzt bis zehn hintereinander folgende generalisierte Anfälle (= vollgekindelt) zu verzeichnen waren.

Schwellenbestimmung der vollgekindelten Mäuse

Nachdem die Mäuse vollgekindelt waren, wurde im Abstand von ein bis zwei Tagen fünf bis sechs Mal die Nachentladungsschwelle bestimmt. Nur Tiere mit einer stabilen (= maximal zwei Reizstromstärken Abweichung) Nachentladungsschwelle wurden im Substanzversuch verwendet.

2.2.3. Substanzversuch

Während des Substanzversuches wurden verschiedene Dosierungen von Rosiglitazon (1 mg/kg, 3 mg/kg, 9 mg/kg gelöst in jeweils 10 ml/kg Aqua ad inj. i.p.) getestet. Vor jedem Substanztest wurde Vehikellösung (Aqua ad inj.) verabreicht und im Anschluss die Anfallsschwelle bestimmt. Zwischen den Vehikel- und den darauffolgenden Substanztests wurde jeweils eine Pause mit einer Zeitdauer von zwei Tagen eingehalten. Bei den Substanzversuchen startete die Schwellenbestimmung mit einer Reizstromstärke von 8 μ A. Bei der Vehikelkontrollschwelle wurde fünf Stufen unter der stabilen Anfallsschwelle begonnen. Die Reizstromstärke wurde nachfolgend im Abstand von einer Minute jeweils um 20 Prozent bis maximal 1000 μ A erhöht. Neben der ADT und den verschiedenen Anfallsparametern wurde auch die GST (*generalized seizure threshold*) bestimmt. Zu Beginn des Substanzversuches wurden dreizehn Tiere zur Testung der Dosierungen geprüft. Diese Mäuse waren in zwei Chargen aufgeteilt. Tiere, die nicht im Substanzversuch getestet wurden, wurden an den Versuchstagen mit der Vehikellösung injiziert und überschwellig bei 700 μ A stimuliert. Die Kontrolltiere wurden ebenfalls mit der Vehikellösung behandelt, in die Glasterrarien gesetzt aber nicht stimuliert.

2.2.4. Massive Kindling

Die Einteilung der Tiere für das *Massive Kindling* erfolgte in drei Tiergruppen: *Kindling/Vehikellösung* (n= 14), *Kindling/Rosiglitazon* (n= 11) und *Sham/Vehikellösung* (n= 10). Tiere der Gruppe *Kindling/Vehikellsg.* wurden zuvor nicht im Substanzversuch geprüft. Vor Beginn des Versuches wurde die Anfallsschwelle der Tiere bestimmt. Drei Tage später startete das *Massive*

Kindling mit einer Dauer von neun Tagen. Den Mäusen wurde je nach Gruppeneinteilung Rosiglitazon (9 mg/kg i.p.) oder Vehikellösung appliziert. Eine Stunde nach Injektion fand die erste Stimulation der Tiere statt. Dabei wurden die SS, SD1, ADD1 sowie ADD2 protokolliert und analysiert. Es folgten weitere vier Stimulationen jeweils im Abstand von einer Stunde. Die Reizstromstärke während des *Massive Kindlings* betrug 700 μ A. An Tag 10 wurde die Anfallsschwelle der Tiere unter Vehikellösung oder Rosiglitazon (9 mg/kg i.p., Vorbehandlungszeit: 1 Stunde) untersucht. Zwei Tage später (Tag 11) wurde jedem Tier die Vehikellösung des Standardantiepileptikums Phenobarbital (NaCl, 10 ml/kg i.p., Vorbehandlungszeit: 30 min) appliziert und nachfolgend die Schwellenbestimmung durchgeführt. Am darauffolgenden Tag (Tag 12) wurde allen Tieren Phenobarbital (6 mg/kg in 10 ml/kg NaCl i.p.; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) injiziert, nach 30 Minuten die Anfallsschwelle bestimmt.

2.3. Transkardiale Perfusion und Herzblutentnahme

Im Anschluss an die Schwellenbestimmung unter Phenobarbital wurden die Tiere mit Pentobarbital (600 mg/kg; Narcoren®, Merial GmbH, Hallbergmoos) euthanasiert, das Blut entnommen und anschließend perfundiert. Die Perfusion der Mäuse wurde entsprechend Kapitel IV.1.7.1 durchgeführt. Bei Bedarf wurde den Tieren wiederholt Pentobarbital injiziert. Die Fixierung des Gewebes erfolgte durch Spülung mit 8%iger Paraformaldehydlösung und 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4) über zehn Minuten. Das entnommene Blut der Mäuse wurde in EDTA-Röhrchen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) aufgefangen und anschließend 30 min bei 4°C zentrifugiert (Centrifuge 5804R, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland). Das Plasma wurde anschließend abpipettiert und in Tubes (Multi®-SafeSeal®Tubes, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) überführt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Hierbei könnten weitere Analysen durchgeführt werden, um einen möglichen Einfluss von Rosiglitazon auf die Metabolisierung auszuschließen.

2.4. Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde das Computerprogramm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) für Windows verwendet. Die Angaben der Daten erfolgte als Mittelwert \pm SEM (*standard error of the mean*,

Mittelwertsfehler, Standardfehler). Der Signifikanzniveau (p-Wert) wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Alle statistischen Analysen wurden zweiseitig ausgeführt. Bei verbundenen Einzeldaten wurde bei normalverteilten Stichproben der gepaarte *Student's t-test* angewendet. Die Auswertung verbundener Daten erfolgte anhand des *Wilcoxon-Tests*. Nichtverbundene, normalverteilte Daten wurden mit Hilfe des ungepaarten *Student's t-test* analysiert. Der *Mann-Whitney-U-Test* wurde zur Auswertung nichtverbundener Stichproben ohne Normalverteilung verwendet.

2.5. Versuchsdesign

Nach der Implantation der teflonisolierten bipolaren Elektrode in die rechte basolaterale Amygdala wurden 12 der 42 Mäuse als Kontrolltiere eingeteilt. Die elektrodenimplantierten Kontrolltiere wurden nicht stimuliert. Im Anschluss an eine Rekonvaleszenzphase von zwei Wochen wurde das Amygdala-*Kindling*-Modell generiert. Dabei wurde zuerst die initiale Nachentladungsschwelle (ADT) bestimmt. Im Anschluss daran fand das „Aufkindeln“ statt. Hierzu wurden die Tiere einmal täglich an Wochentagen mit einer Reizstromstärke von 700 μ A stimuliert bis diese zehn generalisierte Krampfanfälle gezeigt hatten. Danach erfolgte die Bestimmung der ADT und GST. Diese wurde fünf bis sechs Mal gemessen, bis sie einen stabilen Wert erreicht hatten. Ein Tier musste aufgrund von technischen Problemen und drei Tiere aufgrund von schlechtem Allgemeinbefinden von weiteren Versuchen ausgeschlossen werden. Nachdem die Anfallsschwellen der Tiere stabile Werte erreicht haben, wurde Rosiglitazon (1 mg/kg, 3 mg/kg, 9 mg/kg gelöst in jeweils 10 ml/kg Aqua ad inj. i.p.; Vorbehandlungszeit: 1 Stunde) im Hinblick auf den Effekt der verschiedenen Anfallsparameter (SS, SD1, SD2, ADD1 und ADD2) untersucht. Ein Tier verstarb während dieser Phase des Dissertationsvorhabens. Um die Auswaschung der Substanz aus dem Organismus zu garantieren, erfolgte anschließend eine *Wash out*-Phase von mindestens fünf Wochen. Im Anschluss daran erfolgte das *Massive Kindling*. Hierzu wurden die Mäuse an neun hintereinander folgenden Wochentagen fünfmal täglich im Abstand von je einer Stunde stimuliert. Jeweils vor der ersten, täglichen Stimulation wurde den Tieren Rosiglitazon (9 mg/kg in 10 ml/kg Aqua ad inj. i.p.) oder Vehikellösung (Aqua ad inj., 10 ml/kg i.p.) mit einer Vorbehandlungszeit von einer Stunde verabreicht. Die Tiere der Gruppe, der die Vehikellösung verabreicht wurde, wurden zuvor nicht im Substanzversuch getestet. Am zehnten Tag erfolgte dann die Bestimmung der ADT nach

Applikation der Substanz bzw. der Vehikellösung. Zwei Tage danach wurde eine Bestimmung der ADT und GST nach der Gabe von Vehikellösung (NaCl; 10 ml/kg i.p.) durchgeführt. Am nächsten Tag wurde nach Applikation von Phenobarbital (6 mg/kg in 10 ml/kg NaCl i.p.) wiederum die ADT und GST bestimmt. Direkt im Anschluss fand die Tötung und Perfusionsfixierung der Tiere statt. Des Weiteren wurde Blut entnommen und aufbereitet. Die perfusionsfixierten Gehirne wurden anschließend entnommen und aufbewahrt. Ein Tier aus der Gruppe *Kindling/Vehikellsg.* verstarb zwei Tage vor der NaCl-Schwellenbestimmung. Ein Tier aus der Kontrollgruppe und eines aus der *Kindling/Vehikellsg.*-Gruppe mussten aufgrund von technischen Problemen aus den Versuchen genommen werden.

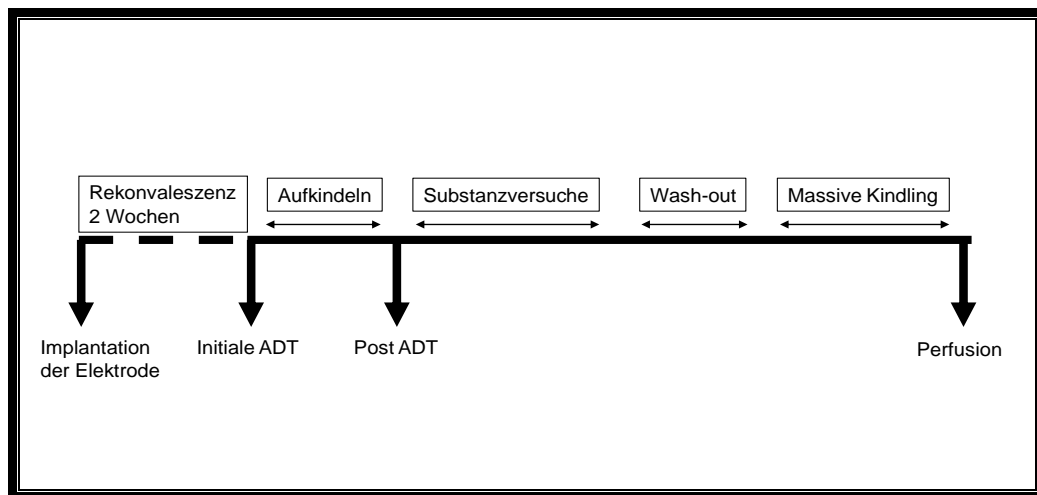


Abb.9 Versuchsdesign und zeitlicher Verlauf des Amygdala-Kindling-Modells

V. ERGEBNISSE

1. Prüfung des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon im Post-Status-Epilepticus-Modell der Temporallappenepilepsie

1.1. Elektrisches SE-Modell

Nach der Elektrodenimplantation (Kap. IV.1.2.1.) wurde bei 29 Ratten durch die Dauerstimulation der basolateralen Amygdala (Kap. IV.1.2.2.) ein sich selbst erhaltender *Status epilepticus* (SSSE) induziert. Dieser SSSE wurde nach einer Zeitdauer von 4 Stunden durch Diazepam beendet. Bei neun Tieren wurde wiederholt Diazepam appliziert, um den SSSE sicher zu beenden. Von den insgesamt 29 Tieren verstarben 13,8% (n=4) *post stimulationem*. 10,3% zeigten keine Anfallsaktivität. Kein Tier (n=0) entwickelte einen ausschließlich fokalen SSSE (SE-Typ I). Fokale Anfälle, die wiederholt von generalisierten krampfhaften Anfällen unterbrochen wurden (SE-Typ II), manifestierten sich bei 3,5% (n=1) und einen generalisierten Anfallstyp (SE-Typ III) zeigten 86,2% (n=25). Die genauen Ergebnisse sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

SE-BLA-Modell				
		SE/Vehikellsg.	SE/Rosiglitazon	Insgesamt
Anzahl der Tiere pro Gruppe		n= 15	n= 14	n= 29 (100%)
Anfallstyp des SSSE	Kein Anfall (Typ 0)	n= 1	n= 2	n= 3 (10,3%)
	Fokaler Anfall (Typ I)	n= 0	n= 0	n= 0 (0%)
	Fokaler Anfall, wiederholt von generalisierten Anfällen unterbrochen (Typ II)	n= 0	n= 1	n= 1 (3,5%)
	Generalisierter Anfall (Typ III)	n= 14	n= 11	n= 25 (86,2%)
Exitus <i>post stimulationem</i>		n= 2	n= 2	n= 4 (13,8%)

Tab. 5 Übersicht über die Tierzahlen in Bezug zum SE-Typ

1.2. Beeinflussung des Blutglukosespiegels

Rosiglitazon besitzt die Fähigkeit die Insulinsensitivität zu erhöhen und wurde aufgrund dessen zur Behandlung des Typ 2 *Diabetes mellitus* beim Menschen eingesetzt (WILLSON et al. 2001). Daher wurde der Blutglukosespiegel der Ratten vor der Verabreichung von Rosiglitazon bzw. der Vehikellösung und nach drei Wochen täglicher Applikation gemessen und verglichen (Kapitel IV.1.4). Zwischen der Rosiglitazon- und Vehikellösung-behandelten Tiergruppe konnte sowohl vor als auch am Ende der Applikationsphase kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

1.3. Erfassung spontaner epileptischer Anfälle

Die meisten Tiere entwickelten einige Wochen nach dem SSSE spontane epileptische Anfälle. Um auf einen möglichen antiepileptogenen Effekt von Rosiglitazon zu prüfen, wurden die Ratten zehn Wochen nach der Dauerstimulation per Video und EEG überwacht. Die Anfälle wurden bezüglich der Anfallshäufigkeit, kumulativen sowie mittleren Anfallsdauer ausgewertet. Insgesamt konnten 20 Tiere überwacht werden (SE/Vehikellösung: n=11; SE/Rosiglitazon: n=8). Es konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bezüglich der Anfallsfrequenz, kumulativen und mittleren Anfallsdauer festgestellt werden.

1.4. Verhaltensuntersuchungen

Im Anschluss an das Video- und EEG-Monitoring folgten die Verhaltensuntersuchungen. Um Verhaltensauffälligkeiten der Tiere zu erfassen, wurden sie zuvor anhand des *Irwin-Score-System* untersucht (Kapitel X.1). Es wurde kein Tier von den Verhaltensuntersuchungen ausgeschlossen. In den nachfolgenden Tests wurden die Gruppen Sham/Vehikellösung (n=7), Sham/Rosiglitazon (n=7), SE/Vehikellösung (n=11), SE/Rosiglitazon (n=8) miteinander verglichen.

1.4.1. Open Field

Der Test *Open Field* dient der Beurteilung von Lokomotion und wurde für die Erfassung angstassoziierter Verhaltensweisen etabliert (HALL 1934; WALSH u. CUMMINS 1976; CRABBE 1986; LANDGRAF u. WIGGER 2002) (Kapitel II.5.2.1). Die vier verschiedenen Gruppen wurden hinsichtlich der zurückgelegten Strecke, der Durchschnittsgeschwindigkeit, der *rearings* und der Aufenthaltsdauer in der inneren und der äußeren Zone untersucht. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Tiergruppen festgestellt werden.

1.4.2. Black White Box

Die *Black White Box* wird zur Erfassung von angstassozierten Verhaltensweisen verwendet (COSTALL et al. 1989) (Kapitel II.5.2.2). Zwischen den Tiergruppen konnte hinsichtlich der Aufenthaltsdauer in dem weißen oder schwarzen Kompartiment kein signifikanter Unterschied verzeichnet werden. Auch die Latenzzeit bis zum Eintritt in den schwarzen Teil der Box sowie die Anzahl der

Übertritte zwischen beiden Kompartimenten und die Anzahl der *stretching postures* wiesen keinen signifikanten Unterschied auf.

1.4.3. Elevated Plus Maze

Das *Elevated Plus Maze* dient der Untersuchung angstassoziierter Verhaltensweisen bei Nagern (HANDLEY u. MITHANI 1984) (Kapitel II.5.2.3). Dabei wurden die Aufenthaltsdauer und die Häufigkeit des Aufenthalts auf den offenen sowie den geschlossenen Armen als auch dem Zentrum des EPM analysiert. Bei den offenen Armen wurde dabei zwischen dem äußeren und dem inneren Anteil des Arms unterschieden. Des Weiteren wurden die zurückgelegte Strecke und die Häufigkeit der *head dips* sowie der *stretching postures* untersucht. Es konnte keine Signifikanz zwischen den Tiergruppen hinsichtlich der untersuchten Parameter festgestellt werden.

1.4.4. Morris Water Maze

Das *Morris Water Maze* (MWM) stellt einen Lern- und Gedächtnistest bezüglich der räumlichen Orientierung bei Nagetieren dar (MORRIS 1984) (Kapitel II.5.2.4). Während des Habituationsdurchganges konnte hinsichtlich der zurückgelegten Strecke sowie der Durchschnittsgeschwindigkeit ein signifikanter Unterschied zwischen den Rosiglitazon-behandelten Kontrolltiere im Vergleich zu den mit Vehikellösung behandelten Kontrolltieren festgestellt werden (Abb. 10).

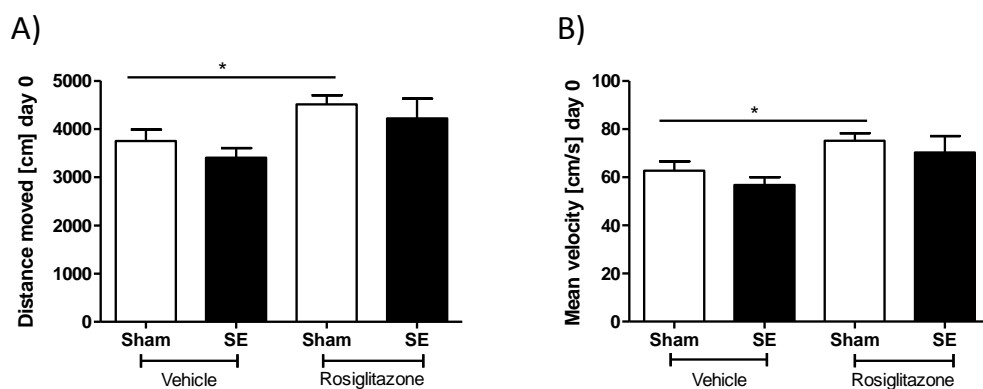


Abb. 10 Effekte von Rosiglitazon im Habituationsdurchgang des Verhaltenstests MWM. A) Zurückgelegte Strecke, B) Mittlere Geschwindigkeit (Mittelwert \pm SEM). Die zurückgelegte Schwimmstrecke und die mittlere Geschwindigkeit waren bei der Rosiglitazon-behandelten Kontrollgruppe signifikant erhöht im Vergleich zur Vehikel-behandelten Kontrollgruppe. (Sham/Vehikellsg.: n= 7, SE/Vehikellsg.: n= 9, Sham/Rosiglitazon: n= 7, SE/Rosiglitazon: n= 8).

Nach der Habituation folgte die sechstägige Akquisitionsphase. An den Tagen 1, 4, 5 und 6 erreichten Vehikel-behandelten Kontrolltiere signifikant schneller die Plattform im Vergleich zu den Vehikel-behandelten SE-Tieren. An Tag 5 fanden benötigen die Rosiglitazon-behandelten SE-Tiere signifikant mehr Zeit zum Auffinden der Plattform verglichen mit den dazugehörigen Kontrolltieren. Bezüglich der Latenzzeit konnte an Tag 2 keine Signifikanz zwischen den Tiergruppen festgestellt werden. Am dritten Tag erreichten die SE/Rosiglitazon-Tiere die Plattform signifikant schneller als die SE/Vehikel-Tiere (Abb. 11, Abb. 12).

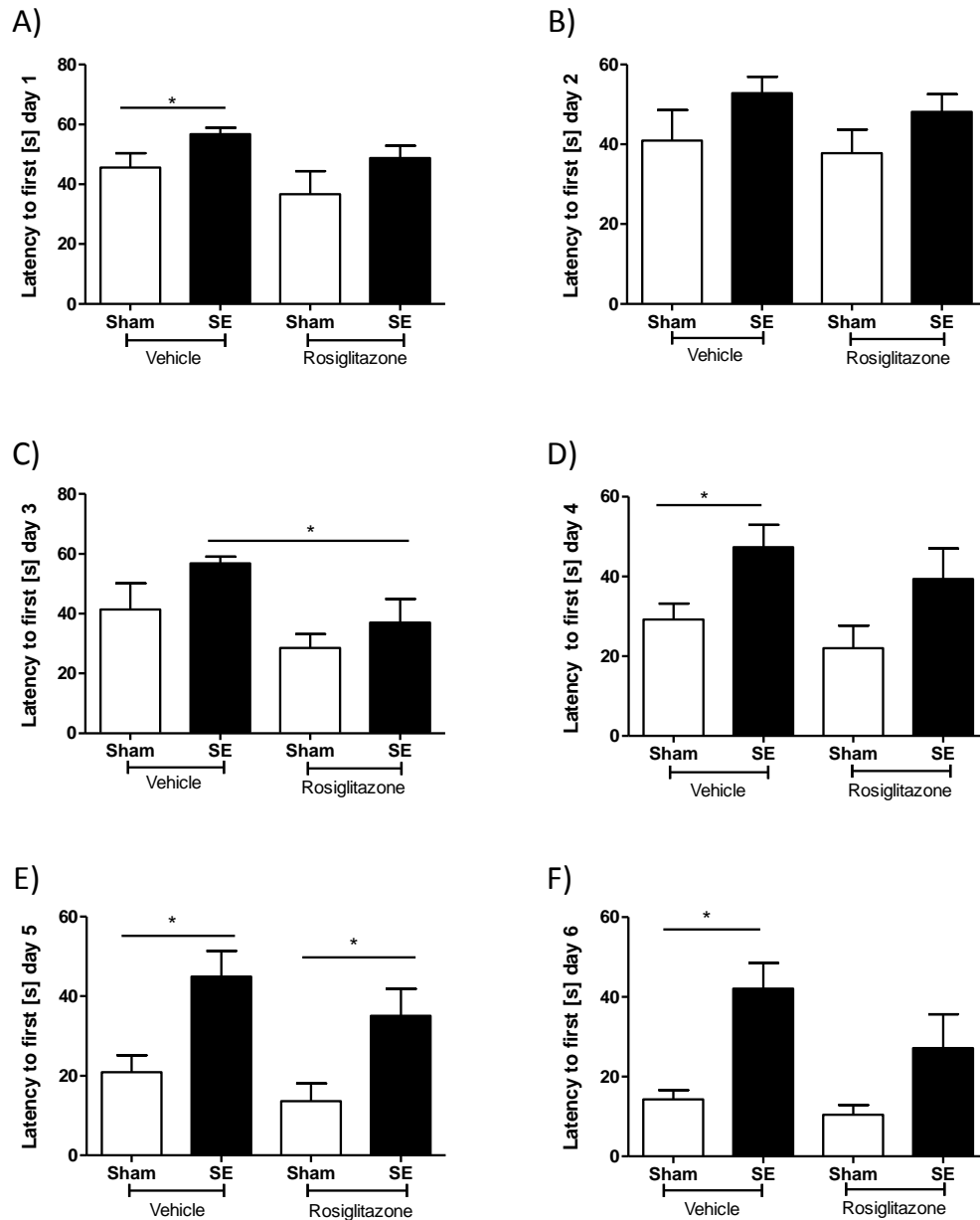


Abb. 11 Effekte von Rosiglitazon während der Akquisitionsphase des MWM. Die Dauer bis zum Auffinden der Plattform (Mittelwert \pm SEM). An den Tagen 1 (A), 4 (D), 5 (E) und 6 (F) erreichten die Vehikel-behandelte Kontrolltiere signifikant schneller die Plattform verglichen mit den dazugehörigen SE-Tiere. An Tag 5 (E) erreichten die Rosiglitazon-behandelten Kontrolltiere signifikant schneller die Plattform verglichen mit den SE/Rosiglitazon-Tiere. An Tag 2 (B) konnte keine Signifikanz zwischen den Tiergruppen festgestellt werden. An Tag 3 (C) benötigten die SE/Rosiglitazon-Tiere signifikant weniger Zeit als die SE/Vehikel-Tiere um die Plattform zu erreichen. (Sham/Vehikellsg.: $n=7$, SE/Vehikellsg.: $n=9$, Sham/Rosiglitazon: $n=7$, SE/Rosiglitazon: $n=8$).

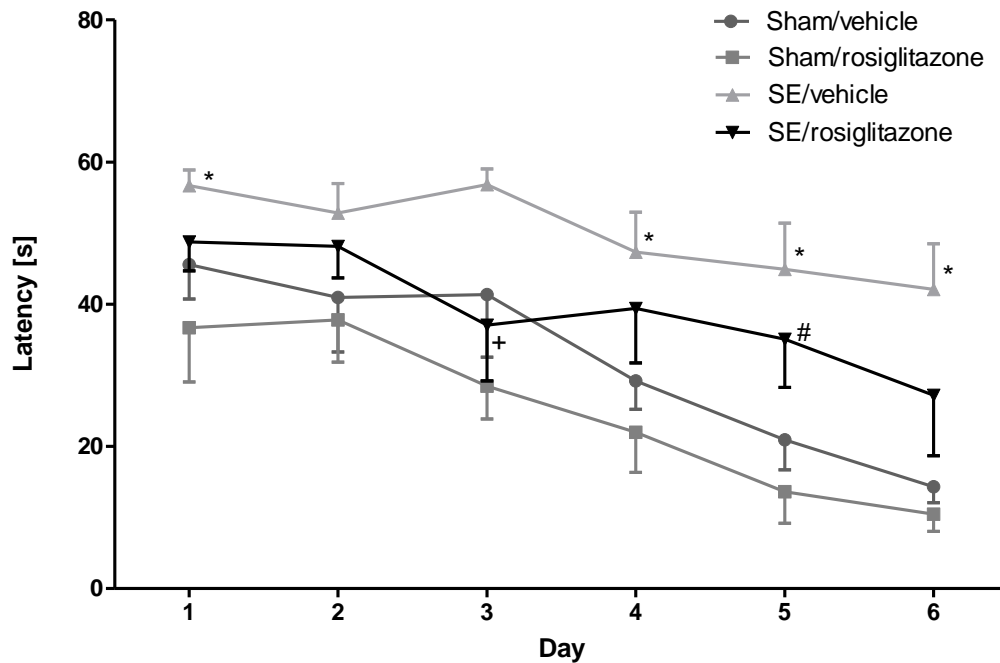


Abb. 12 Effekte von Rosiglitazon während der Akquisitionsphase des MWM. Lernkurve für das mehrtägige Training im MWM bezüglich der Latenzzeit bis zum ersten Auffinden der Plattform (Mittelwert \pm SEM). * = signifikant zu Sham/Vehikellsg., # = signifikant zu SE/Rosiglitazon, + = signifikant zu SE/Vehikellsg. (Sham/Vehikellsg.: n= 7, SE/Vehikellsg.: n= 9, Sham/Rosiglitazon: n= 7, SE/Rosiglitazon: n= 8).

Während der *spatial probe* war die Latenzzeit bis zum Erreichen der früheren Plattformposition bei den Kontrolltieren signifikant niedriger im Vergleich zu den dazugehörigen SE-Tieren. Des Weiteren erreichten die Rosiglitazon-behandelten Kontrolltiere diesen Bereich signifikant schneller als die Kontrolltiere, denen die Vehikellösung verabreicht wurde. Die mit Rosiglitazon behandelten SE-Tiere wiesen eine signifikant höhere Durchschnittsgeschwindigkeit auf im Vergleich zu den Vehikel-behandelten SE-Tieren. Die Rosiglitazon-behandelten Kontrolltiere kreuzten signifikant häufiger den Bereich der früheren Plattform als die Vehikel-behandelten Kontrolltiere und die mit Rosiglitazon behandelten SE-Tiere. Hinsichtlich der Aufenthaltsdauer in dem Quadrant, in dem zuvor die Plattform war, konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 13).

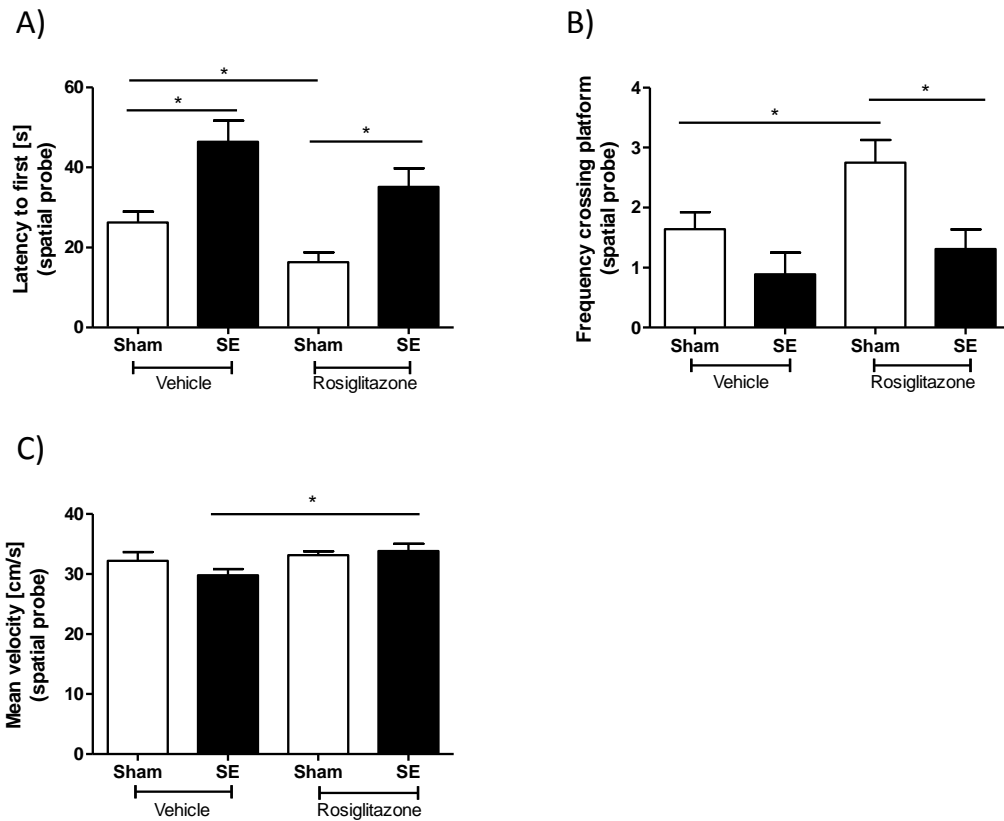


Abb. 13 Effekte von Rosiglitazon während der *spatial probe* des MWM. A) Latenzzeit bis zum ersten Auffinden der früheren Plattformposition, B) Anzahl der Kreuzungen über ehemalige Plattformposition, C) Durchschnittsgeschwindigkeit (Mittelwert \pm SEM). Die Kontrolltiere erreichten signifikant schneller die ehemalige Plattformposition im Vergleich zu den dazugehörigen SE-Tieren. Die Rosiglitazon-behandelten Kontrolltiere benötigten signifikant weniger Zeit um diesen Bereich zu erreichen verglichen mit den Vehikel-behandelten Kontrolltieren. Die Rosiglitazon-behandelten Kontrolltiere kreuzten signifikant häufiger den Bereich der früheren Plattform als die Vehikel-behandelten Kontrolltiere und die mit Rosiglitazon behandelten SE-Tiere. Die Rosiglitazon-behandelten SE-Tiere wiesen eine signifikant höhere Durchschnittsgeschwindigkeit auf als die Vehikel-behandelten SE-Tiere. (Sham/Vehikellsg.: $n=7$, SE/Vehikellsg.: $n=9$, Sham/Rosiglitazon: $n=7$, SE/Rosiglitazon: $n=8$).

1.5. Immunhistochemische Analysen

1.5.1. Nissl-Färbung

Mit Hilfe der Nissl-Färbung und des *Score*-Systems konnte der Grad der Neurodegeneration im Bereich des parietalen und piriformen Cortex, der CA₁-, CA₂-, CA_{3a}- und CA_{3c/4}-Region ermittelt und analysiert werden (Kapitel IV.1.8.1 und IV.1.9). In allen untersuchten Bereichen war das Ausmaß der Neurodegeneration der SE-Gruppen zu ihrer jeweiligen Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abb. 14).

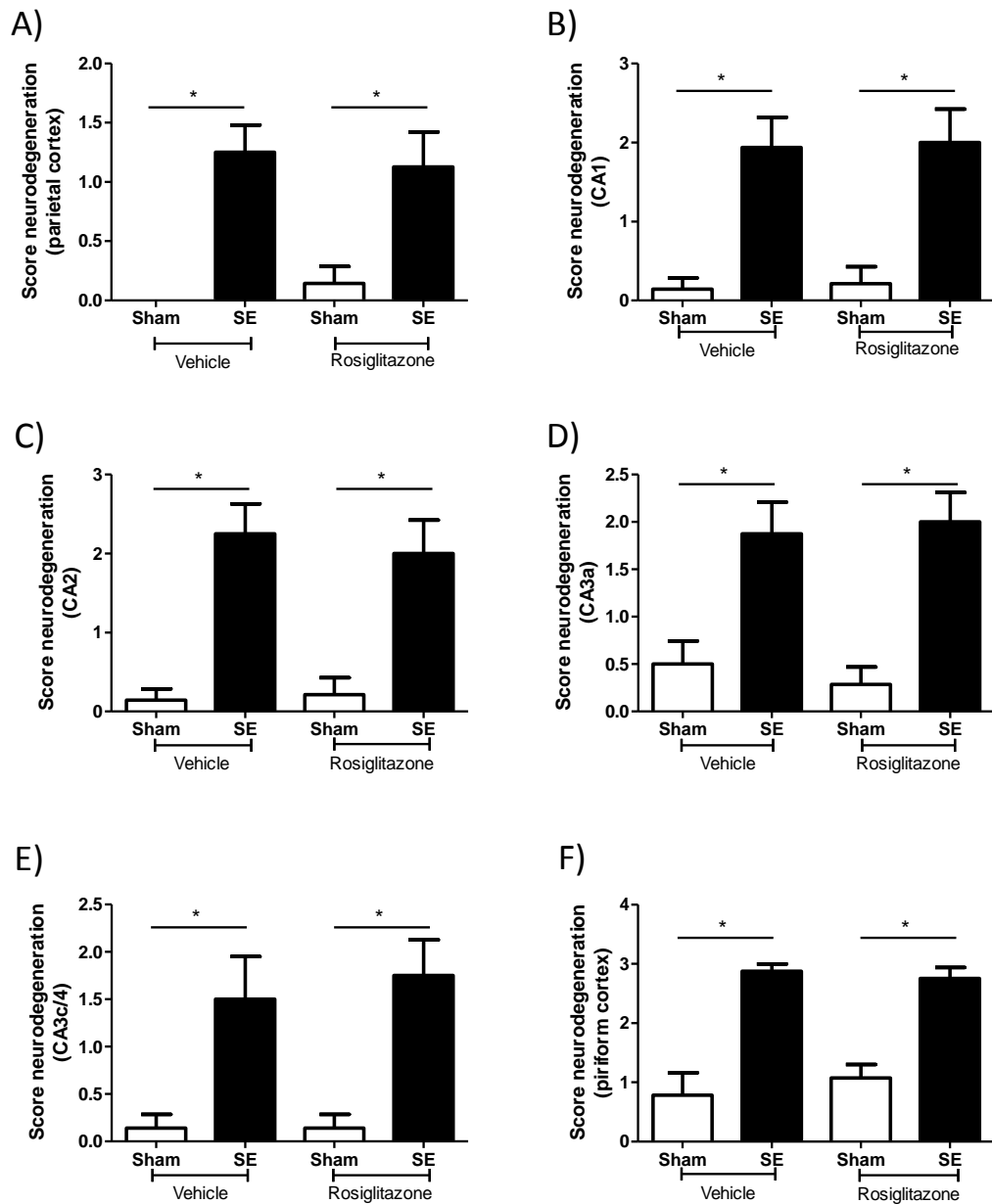


Abb. 14 Effekte von Rosiglitazon auf die Neurodegeneration. Neurodegenerative Veränderungen im parietalen Cortex (A), in der CA₁- (B), CA₂- (C), CA_{3a}- (D) und CA_{3c/4}-Region (E) sowie im piriformen Cortex (F) (Mittelwert \pm SEM). In allen untersuchten Bereichen waren die neurodegenerativen Veränderungen bei den SE-Gruppen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe signifikant erhöht. (Sham/Vehikellsg.: n= 7, SE/Vehikellsg.: n= 8, Sham/Rosiglitazon: n= 7, SE/Rosiglitazon: n= 8).

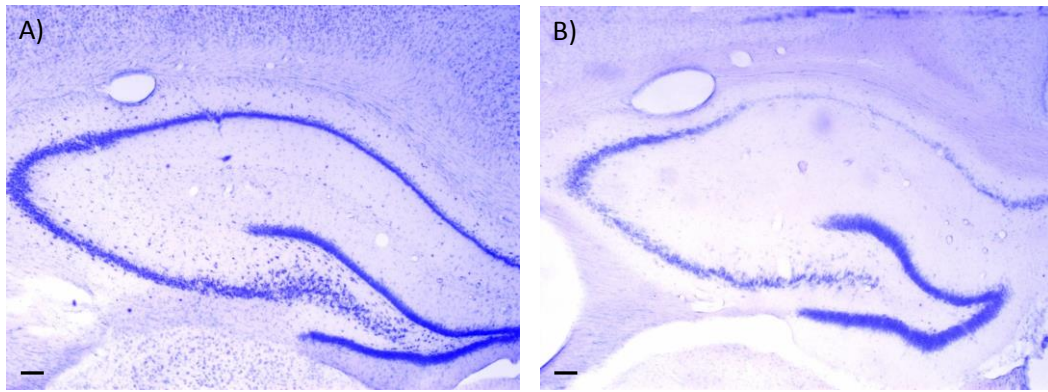


Abb. 15 Nissl-Färbung zur Bestimmung des Grades der Neurodegeneration. Ausmaß der Neurodegeneration im Bereich des Hippocampus bei einem mit Vehikellsg. behandelten Sham-Tier (A) und einem mit Vehikellsg. behandelten SE-Tier (B). Maßstabbalken = 100 µm.

Mit Hilfe einer stereologischen Zählmethode wurden die Thionin-gefärbten Zellen im Hilus erfasst und anschließend ausgewertet (Kap.IV.1.9). Bei den Rosiglitazon-behandelten SE-Tieren befanden sich sowohl absolut als auch relativ signifikant weniger Thionin-positive Zellen im Hilus im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe. Bezüglich der relativen Anzahl wurden bei den Vehikel-behandelten Kontrolltieren verglichen mit der dazugehörigen SE-Gruppe signifikant mehr Thionin-markierte Zellen festgestellt (Abb. 16). Aufgrund von Rissen im Gewebe konnte je ein Tier der Gruppe Sham/Rosiglitazon, SE/Rosiglitazon und SE/Vehikellösung nicht ausgewertet werden.

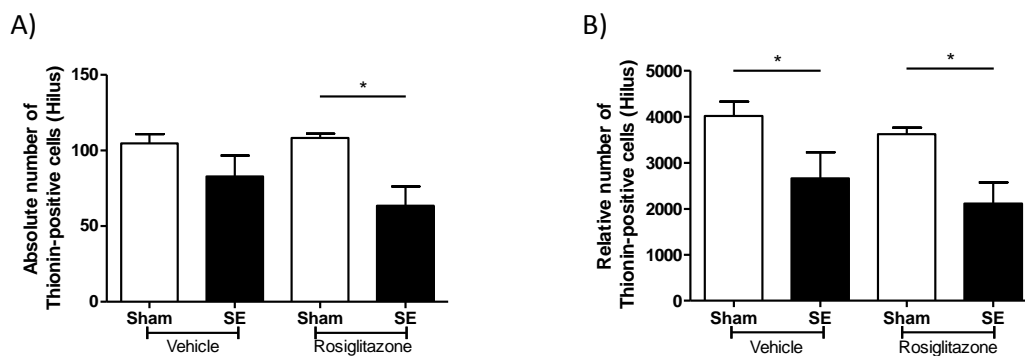


Abb. 16 Effekte von Rosiglitazon auf die Anzahl Thionin-positiver Zellen im Hilus (Mittelwert \pm SEM). A) Absolute Anzahl, B) Relative Anzahl. Die Rosiglitazon-behandelten SE-Tiere hatten absolut und relativ signifikant weniger Thionin-positive Zellen im Hilus im Vergleich zur dazugehörigen Kontrollgruppe. Die Vehikel-behandelten SE-Tiere wiesen im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe eine signifikant geringere relative Anzahl Thionin-markierter Zellen auf. (Sham/Vehikellsg.: n = 7, SE/Vehikellsg.: n = 7, Sham/Rosiglitazon: n = 6, SE/Rosiglitazon: n = 7).

1.5.2. Interleukin-1 beta

Die Quantifizierung von Interleukin-1 beta (IL-1 β) im Hilus erfolgte mit Hilfe der stereologischen Zählmethode „*optical fractionator*“ (Kapitel IV.1.9). IL-1 β ist als inflammatorisches Zytokin ein wichtiger Marker zur Bestimmung des Ausmaßes von Entzündungsreaktionen. Die Rosiglitazon-behandelten SE-Tiere wiesen sowohl bei der absoluten als auch bei der relativen Zahl IL-1 β immunreaktiver Zellen einen signifikant erhöhten Wert im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe auf. Bei der relativen Zahl wurde bei den Vehikel-behandelten SE-Tieren ein signifikant höherer Wert an IL-1 β verglichen mit der dazugehörigen Kontrollgruppe festgestellt. Zwei Tiere der Gruppe SE/Vehikel konnten aufgrund von Rissen im Gewebe nicht ausgewertet werden. (Abb. 17).

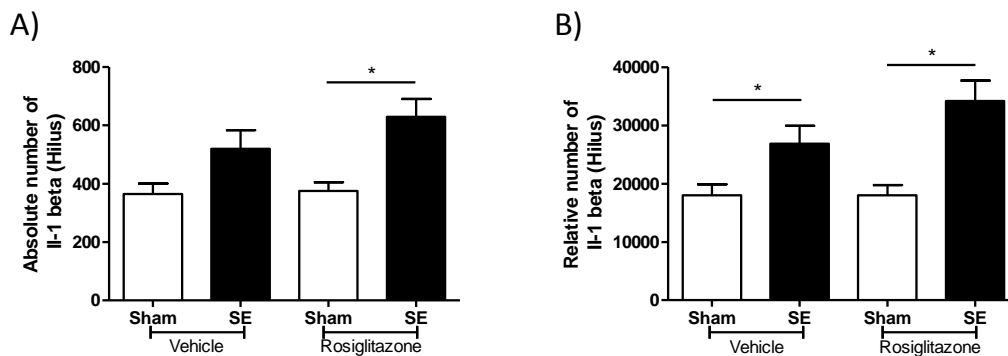


Abb. 17 Effekte von Rosiglitazon auf die Expression des inflammatorischen Zytokins IL-1 β . A) absolute Zahl IL-1 β immunreaktiver Zellen im Hilus, B) relative Zahl IL-1 β immunreaktiver Zellen im Hilus (Mittelwert \pm SEM). Die absolute Zahl IL-1 β immunreaktiver Zellen war bei der Rosiglitazon-behandelten SE-Gruppe im Vergleich zur dazugehörigen Kontrollgruppe signifikant erhöht. Bei beiden SE-Gruppen war im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe die relative Zahl IL-1 β immunreaktiver Zellen signifikant erhöht. (Sham/Vehikellsg.: n=7, SE/Vehikellsg.: n=6, Sham/Rosiglitazon: n=7, SE/Rosiglitazon: n=8).

1.5.3. BrdU/NeuN

Zur Analyse neugebildeter Neuronen wurde den Tieren der Zellproliferationsmarker BrdU nach dem SE injiziert (Kap. IV.1.8.3). Die mit Rosiglitazon behandelten epileptischen Tiere wiesen im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe signifikant mehr BrdU-positive sowie BrdU/NeuN-positive Zellen auf (Abb. 18).

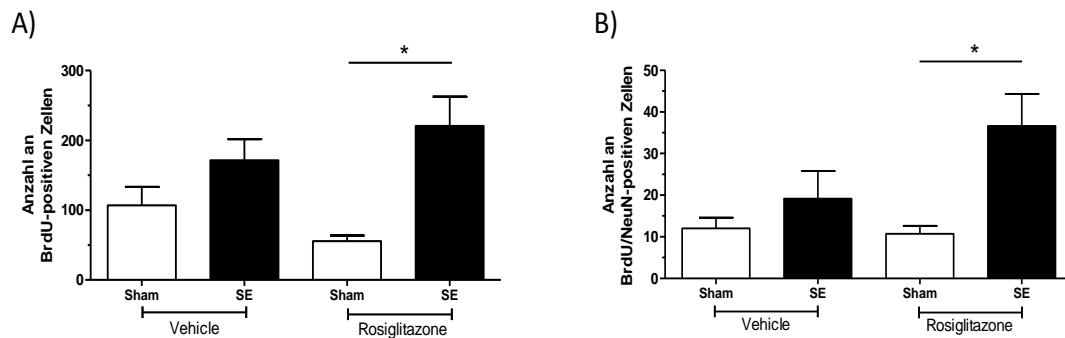


Abb. 18 Effekte von Rosiglitazon auf die Anzahl BrdU-markierter und BrdU/NeuN-doppelmarkierter Zellen im *Gyrus dentatus*. A) Anzahl BrdU-positiver Zellen, B) Anzahl BrdU/NeuN-positiver Zellen (Mittelwert \pm SEM). Die Rosiglitazon-behandelten SE-Tiere wiesen im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe signifikant mehr BrdU-positive sowie BrdU/NeuN-positive Zellen auf (Sham/Vehikellsg.: $n=7$, SE/Vehikellsg.: $n=6$, Sham/Rosiglitazon: $n=7$, SE/Rosiglitazon: $n=8$).

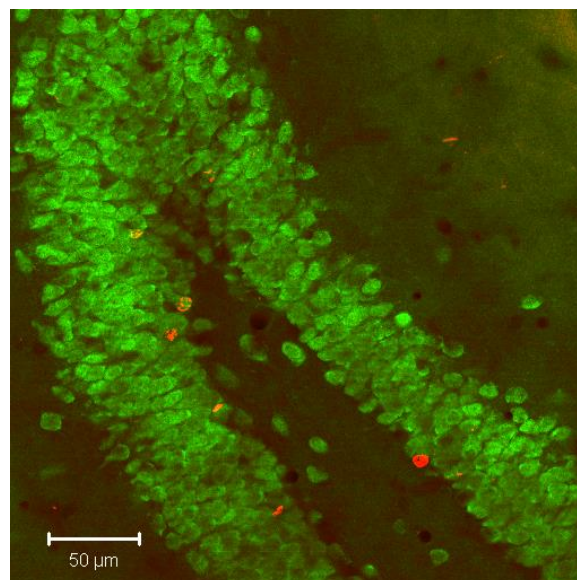


Abb. 19 Ausschnitt des *Gyrus dentatus*.

1.5.4. ED1

Die Erfassung des Ausmaßes der Mikrogliaaktivierung erfolgte mittels eines *Score*-Systems (Kapitel IV.1.9). Im *Gyrus dentatus*, der CA₁- und CA₂-Region sowie im piriformen Cortex konnte bei den SE-Gruppen im Vergleich zu ihren Kontrollgruppen signifikant mehr aktivierte Mikroglia dargestellt werden. Im Hilus als auch in der CA_{3c/4}-Region wiesen nur die Vehikel-behandelten SE-Tiere eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den dazugehörigen Kontrolltieren auf (Abb. 20).

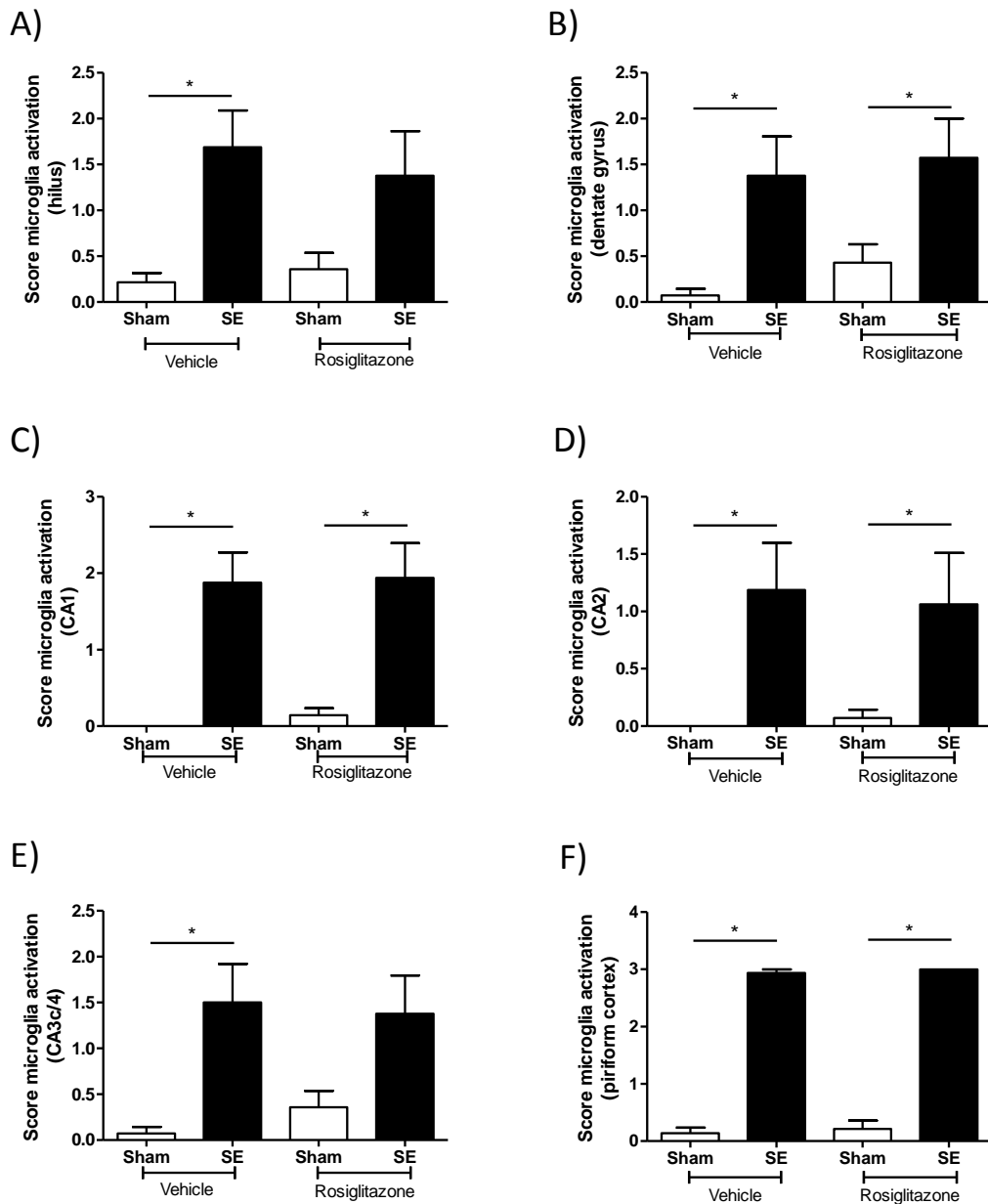


Abb. 20 Effekte von Rosiglitazon auf die Aktivierung der Mikroglia. Mikrogliaaktivierung im Bereich des Hilus (A), *Gyrus dentatus* (B), der CA₁- (C), CA₂- (D), CA_{3c/4}-Region (E) sowie des piriformen Cortex (F) (Mittelwert \pm SEM). Im *Gyrus dentatus*, der CA₁- und CA₂-Region als auch im piriformen Cortex war bei den SE-Gruppen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe die aktivierte Mikroglia signifikant erhöht. Im Hilus und in der CA_{3c/4}-Region wiesen die Vehikel-behandelten SE-Tiere eine signifikant erhöhte Anzahl mikroglialer Zellen verglichen mit ihren Kontrolltieren auf. (Sham/Vehikellsg.: n=7, SE/Vehikellsg.: n=8, Sham/Rosiglitazon: n=7, SE/Rosiglitazon: n=8).

2. Prüfung des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon im Amygdala-Kindling-Modell der Temporallappenepilepsie

2.1. Wirksamkeit verschiedener Dosierungen von Rosiglitazon

Während des Substanzversuches (Kapitel IV.2.2.3) wurden drei verschiedene

Dosierungen (1 mg/kg, 3 mg/kg, 9 mg/kg) von Rosiglitazon getestet. Diese wurden jeweils mit einer zuvor durchgeführten Vehikelkontrollschwelle verglichen. Konnte bei der Schwellenuntersuchung kein Anfall ausgelöst werden, wurde zur Analyse der ADT eine Reizstromstärke von 1000 μ A verwendet. Hinsichtlich der Krampfschwere (SS), der Anfallsdauer (SD1 und SD2) als auch der Nachentladungsdauer (ADD1 und ADD2) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Daten der Behandlungsversuche und den Daten der zuvor durchgeführten Vehikelkontrollversuchen festgestellt werden. Mehrere Tiere zeigten im Verlauf des Versuches auch nach längerer Pause keine Anfallsaktivität mehr. Daher konnten nur acht Tiere ausgewertet werden.

2.2. Effekt von Rosiglitazon auf die Wirksamkeit des Standardantiepileptikums Phenobarbital

Bezüglich der folgenden Ergebnisse wurden die Daten der Tiere ausgewertet, die zu Beginn des *Massive Kindlings* drei aufeinanderfolgende generalisierte Anfälle aufwiesen. Im Verlaufe des *Massive Kindling* wurde die Anfallsschwere (*seizure severity*, SS), die mittlere SS, die Anzahl der generalisierten Anfälle sowie die kumulative Dauer der motorischen Krampfanfälle der Rosiglitazon-behandelten Tiergruppe im Vergleich zur Vehikelkontrollgruppe analysiert. Die kumulative Dauer der motorischen Krampfanfälle war bei den Rosiglitazon-behandelten Tieren signifikant erniedrigt. Bei den restlichen untersuchten Parametern konnte keine Signifikanz festgestellt werden (Abb. 21).

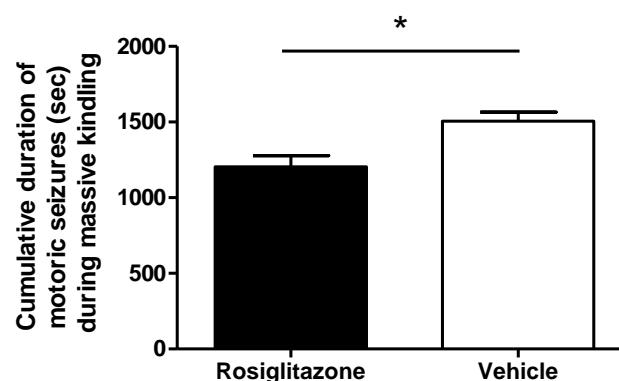


Abb. 21 Effekte von Rosiglitazon auf die kumulative Dauer der motorischen Anfälle während des *Massive Kindling* (Mittelwert \pm SEM). Die Rosiglitazon-behandelten Tiere hatten eine signifikant geringere kumulative Gesamtdauer motorischer Anfälle im Vergleich zu der Vehikel-behandelten Kontrollgruppe. (*Kindling*/Rosiglitazon: n= 8; *Kindling*/Vehikellsg.: n= 5).

Vor Beginn und nach dem *Massive Kindling* wurde die Anfallsschwelle beider Tiergruppen bestimmt. Es wurden die Anfallsparameter GST, ADT, SD1, SD2, ADD1 und ADD2 analysiert. Konnte während der Schwellenbestimmung kein Anfall ausgelöst werden, so wurde zur Berechnung der mittleren ADT und GST die maximale Reizstromstärke (1000 μ A) verwendet. Die ADT und GST waren bei der Vehikelkontrollgruppe nach dem *Massive Kindling* signifikant erhöht. Bei der Rosiglitazon-behandelten Gruppe konnte eine signifikant erhöhte ADT nach dem *Massive Kindling* festgestellt werden. Bei den restlichen Anfallsparametern bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Tiergruppen (Abb. 22).

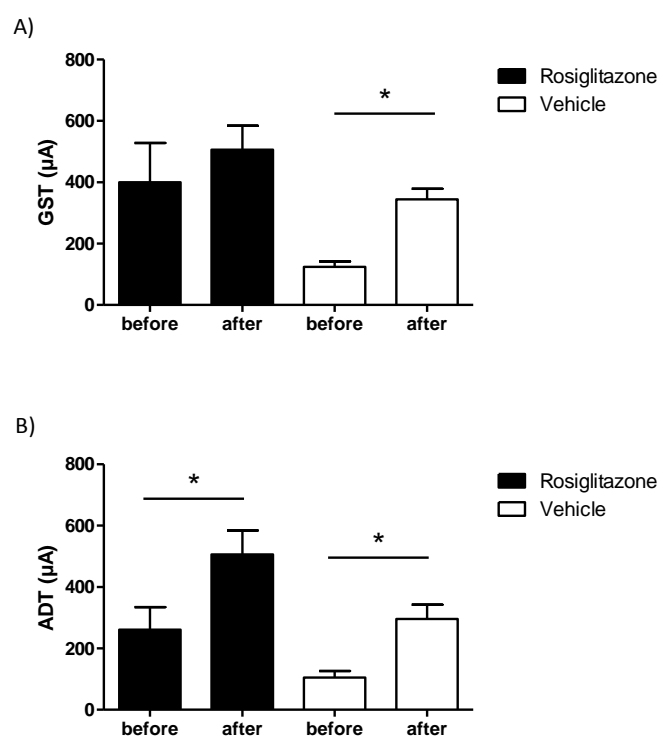


Abb. 22 Effekte von Rosiglitazon auf die Anfallsschwelle vor und nach dem *Massive Kindling*: GST (A), ADT (B) (Mittelwert \pm SEM). (*Kindling*/Rosiglitazon: n= 8; *Kindling*/Vehikellsg.: n= 5).

Nach Ablauf des *Massive Kindling* wurde die Anfallsschwelle bei beiden Tiergruppen unter Verabreichung der Vehikellösung von Phenobarbital (NaCl) bestimmt. Einen Tag später erfolgte dann die Schwellenbestimmung nachdem Phenobarbital appliziert wurde. Jede Tiergruppe wurde hinsichtlich der Anfallsparameter (ADT, GST, SD1, SD2, ADD1, ADD2) sowie dem Schwellenanstieg (ADT, GST) unter Phenobarbital im Vergleich zur dazugehörigen Vehikelkontrollschwelle analysiert. Konnte während der Schwellenbestimmung kein Anfall ausgelöst werden, so wurde auch hier zur

Berechnung der mittleren ADT und GST eine maximale Reizstromstärke (1000 μ A) verwendet. Hinsichtlich der erwähnten Anfallsparameter sowie dem Schwellenanstieg konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Tiergruppen festgestellt werden.

VI. DISKUSSION

Epilepsien gehören sowohl bei Hund und Katze als auch beim Menschen zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen (KNOWLES 1998; CHANG u. LOWENSTEIN 2003; NGUGI et al. 2010). Die mit der Epilepsieerkrankung assoziierten psychiatrischen Komorbiditäten belasten zusätzlich zu den epileptischen Anfällen das alltägliche Leben der Patienten (LEHRNER et al. 1999; JOHNSON et al. 2004; FISHER et al. 2005; SHIHAB et al. 2011). Hinsichtlich der Behandlung von Epilepsieerkrankungen stellt zudem die Problematik der Pharmakoresistenz ein großes Hindernis dar. Circa ein Drittel der Epilepsiepatienten sind von dieser Komplikation betroffen (HITIRIS et al. 2007). Es ist demnach von herausragender Bedeutung nach neuen Therapiemöglichkeiten zu forschen. Bei symptomatischen Epilepsien stellt die Beeinflussung des Prozesses der Epilepsieentstehung (Epileptogenese), der in Folge eines initialen Insultes auftritt, einen wichtigen Ansatz dar (PITKANEN et al. 2007). Inflammatorischen Vorgängen wird im Rahmen der Epileptogenese eine bedeutende Funktion zugeschrieben (VEZZANI et al. 2013). Im Vordergrund steht hierbei vor allem die Population der Mikrogliazellen, die in Folge ihrer Aktivierung eine Reihe inflammatorischer Mediatoren freisetzt (ZIMMER et al. 1997; PLATA-SALAMAN et al. 2000; RAVIZZA et al. 2005). Neben dieser Beteiligung an inflammatorischen Prozessen können aktivierte Mikrogliazellen jedoch auch neuroprotektiv wirken (GORDON 2003; MOSSER 2003; MICHELUCCI et al. 2009). Die pharmakologische Beeinflussung der Mikrogliafunktion zum regenerativen Phänotyp und der dadurch vermittelte positive Effekt konnte bereits in verschiedenen Studien neurologischer Erkrankungen nachgewiesen werden (KIAEI et al. 2005; LANDRETH et al. 2008; CARTA u. PISANU 2013). Dabei konnte gezeigt werden, dass insbesondere PPAR γ -Agonisten einen „Shift“ hin zu einem neuroprotektiven und antiinflammatorischen Phänotyp von Mikrogliazellen begünstigen. Dieser Effekt ist auf die Unterdrückung der Expression inflammatorischer Transkriptionsfaktoren zurückzuführen (MORAES et al. 2006). Die Aktivierung von PPAR γ wird derzeit als Ansatzpunkt zur Therapie verschiedenster neurologischer Erkrankungen diskutiert (CARTA u. PISANU 2013). In diesem Dissertationsvorhaben wurde der Effekt des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon in

zwei chronischen Epilepsiemodellen untersucht. Rosiglitazon wurde bereits unter dem Namen Avandia® von der Firma GlaxoSmithKline zur Behandlung des Typ 2 *Diabetes mellitus* eingesetzt. Rosiglitazon beeinflusst den Glukosestoffwechsel durch die Erhöhung der Insulinsensitivität (WILLSON et al. 2001). Aufgrund von spezifischen Nebenwirkungen bei *Diabetes mellitus*-Patienten musste dieses Präparat jedoch wieder vom Markt genommen werden (MARKS 2013).

1. Post-Status-Epilepticus-Modell

Die Mehrheit der Tiere entwickelt im Anschluss an einen sich selbst-erhaltenden *Status epilepticus* mit einer zeitlichen Dauer von vier Stunden chronische Anfälle. Die anhaltende Anfallsaktivität führte durch die damit verbundenen neuroplastischen Veränderungen zu neurodegenerativen Prozessen (BRANDT et al. 2003). Im Rahmen dieser Studie hatte die Behandlung der Ratten mit Rosiglitazon im Anschluss an einen induzierten *Status epilepticus* keinen Effekt auf die Anfallsfrequenz, die Anfallsdauer und die mittlere Anfallsdauer sich manifestierender spontaner epileptische Anfälle (Kap. V.1.3). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu einer früheren Studie von HONG et al. (2013). Hier konnte die Behandlung mit Rosiglitazon im chemischen SE-Modell das Auftreten spontaner Anfälle vermindern. Allerdings wurde in dieser Studie Rosiglitazon prophylaktisch, d.h. vor dem *Status epilepticus* verabreicht. Dies widerspricht jedoch der klinischen Situation von Epilepsiepatienten. In der klinischen Praxis ist in den meisten Fällen eine Behandlung erst nach Eintreten eines initialen Insultes möglich. Es ist also davon auszugehen, dass in dieser Studie die Behandlung mit Rosiglitazon in erster Linie über eine Beeinflussung des nachfolgenden ausgelösten SE und weniger über einen modifizierenden Effekt auf die Epileptogenese das Auftreten der spontanen Anfälle beeinflusst hat. Des Weiteren wurde in der besagten Arbeit von Hong et al. (2013) mit der Auswertung der Manifestation spontaner Anfälle bereits zwei Wochen nach *Status epilepticus* begonnen (HONG et al. 2013). Jedoch entwickeln die meisten Tiere erst drei bis vier Wochen nach dem *Status epilepticus* spontane Anfälle. Des Weiteren steigert sich die Anfallsfrequenz bei einigen Tieren progressiv (BRANDT et al. 2003).

Die anfallsinduzierte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine bewirkten epilepsieassoziierte pathologische Veränderungen im Gehirn (VEZZANI et al. 2008). Diese Veränderungen umfassen beispielsweise neuronalen Zelltod,

Neurogenese, reaktive Gliose und das Aussprossen von Moosfasern (MCNAMARA 1994; PARENT u. LOWENSTEIN 1997; JANKOWSKY u. PATTERSON 2001). Nachfolgend können diese epilepsiebedingten Schädigungen zu Verhaltensänderungen sowie kognitiven Defiziten führen (KOTLOSKI et al. 2002; MAZARATI et al. 2007; DUMAN 2009). Der Effekt von Rosiglitazon auf die Entwicklung psychiatrischer Komorbiditäten wurde mit Hilfe verschiedener Verhaltensuntersuchungen analysiert. Die Beeinflussung angstassoziierter Verhaltensweisen der Tiere wurde anhand der Verhaltenstests *Black White Box* und *Elevated Plus Maze* untersucht. Das lokomotorische Verhalten der Tiere wurde mit Hilfe des *Open Fields* evaluiert (Kap.IV.1.6). Dabei konnte in keinem der aufgeführten Untersuchungen ein Effekt der Behandlung festgestellt werden (Kap.V.1.4). Die Evaluierung des Lern- und Gedächtnisvermögens der Tiere wurde an Hand von Verhaltensuntersuchungen im *Morris Water Maze* durchgeführt (Kap.IV.1.6.4). Während der Akquisitionsphase wurde das Lernvermögen der Tiere untersucht. Hingegen wurde im Rahmen der *spatial probe* (Extinktionsphase) durch die Analyse der Suchstrategien die räumliche Gedächtnisleistung der Ratten evaluiert (BRANDEIS et al. 1989; D'HOOGHE u. DE DEYN 2001). In früheren Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass epileptische Tiere hinsichtlich ihrer Lern- und Gedächtnisleistung Defizite aufweisen (BRANDT et al. 2006; SEEGER et al. 2011). Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation bestätigt werden (Abb. 11, Abb. 12). Der Effekt von Rosiglitazon auf das Lern- und Gedächtnisvermögen wurde bereits in mehreren Tiermodellen unterschiedlicher Erkrankungen anhand des *Morris Water Maze*-Test evaluiert. Dabei konnte die Behandlung mit Rosiglitazon positive Wirkungen erzielen (SAIN et al. 2011; SAYAN-OZACMAK et al. 2011; WANG et al. 2012). Im Rahmen einer *Diabetes mellitus*-Studie konnten auch beim Menschen bereits positive Effekte von Rosiglitazon auf die Lern- und Gedächtnisleistung nachgewiesen werden (ABBATECOLA et al. 2010). Eine klinische Studie bezüglich der Alzheimer-Erkrankung konnte jedoch keine verbesserte kognitive Leistung infolge der Therapie mit Rosiglitazon nachweisen (GOLD et al. 2010b). Im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens wurde während der Habituationsphase eine Hyperlokomotion der Rosiglitazon-behandelten Kontrolltiere im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Kontrolltieren festgestellt (Kap. V.1.4.4, Abb. 10). Diese Hyperlokomotion kann ursächlich für Abweichungen nachfolgender

Ergebnisse des *Morris Water Maze* sein. Eine gesteigerte Aktivität konnte durch die Rosiglitazon-Behandlung in den anderen Verhaltensuntersuchungen, während denen sich die Tiere jedoch nicht schwimmend fortbewegen, nicht bestätigt werden. Während der Akquisitionsphase konnte an Tag 3 bei den epileptischen Tieren ein positiver Effekt von Rosiglitazon auf das Lernvermögen nachgewiesen werden. Im Hinblick auf die Lernkurve der Tiere bestand zwischen den Vehikel-behandelten Tiergruppen häufiger ein signifikanter Unterschied (Tag 1, 4, 5 und 6) im Vergleich zu den Rosiglitazon-behandelten Tiergruppen (Tag 5). Diese Ergebnisse geben einen weiteren Hinweis darauf, dass die Behandlung mit Rosiglitazon die Lernleistung der Tiere langfristig beeinflussen kann (Abb. 11, Abb. 12). Es konnte jedoch kein Effekt der Rosiglitazon-Behandlung bei den epileptischen Tieren auf die räumliche Gedächtnisleistung im Rahmen der *spatial probe* festgestellt werden. Die Rosiglitazon-behandelten Kontrolltiere konnten während der *spatial probe* signifikant schneller die Position der früheren Plattform auffinden und kreuzten häufiger diesen Bereich verglichen mit den Vehikel-behandelten Kontrolltieren. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass der PPAR γ -Agonist Rosiglitazon in der Lage ist, das räumliche Gedächtnisvermögen bei gesunden Ratten zu steigern. Während der *spatial probe* war die Durchschnittsgeschwindigkeit der Rosiglitazon-behandelten *Status epilepticus*-Tiere im Vergleich mit den Vehikel-behandelten epileptischen Tieren erhöht. Dies kann zu Abweichungen der Ergebnisse im Hinblick auf die Gedächtnisleistung der Tiere führen (Abb. 13). Eine Studie, in welcher Rosiglitazon in einem akuten *Status-Epilepticus*-Modell eingesetzt wurde, konnte bereits eine positive Beeinflussung der Rosiglitazon-Behandlung auf das räumliche Lernvermögen feststellen. Allerdings wurden die Rosiglitazon-Applikationen im Rahmen dieser Studie auch während der Untersuchungen im *Morris Water Maze* fortgesetzt. Des Weiteren wurde mit der Behandlung vor dem *Status epilepticus* begonnen, was wiederum eine Modulation des Insults als Folge haben kann (HONG et al. 2012). Die Ergebnisse dieses Dissertationsvorhabens geben Hinweise auf eine positive Beeinflussung durch Rosiglitazon auf das Lernvermögen von *Status epilepticus*-Tiere. Die gesteigerte Gedächtnisleistung der Rosiglitazon-behandelten Kontrolltiere zeigen, dass Rosiglitazon möglicherweise zukünftig zur Steigerung des Gedächtnisses bei gesunden Tieren oder Menschen eingesetzt werden kann. Um herauszufinden, ob Rosiglitazon auch die Gedächtnisleistung anderer Tierarten zu steigern vermag, bedarf es in Zukunft weiterer Untersuchungen.

Epileptische Anfälle führen auf zellulärer Ebene zu einem massiven Verlust neuronaler Zellen im Hippocampus sowie im piriformen Cortex (JUTILA et al. 2002; LICKO et al. 2013; RUSSMANN et al. 2013). Analog dazu konnte in der vorliegenden Studie eine neuronale Degeneration in der CA₁-, CA₂-, CA_{3a}- und CA_{3c/4}-Region sowie im piriformen Cortex mit Hilfe eines *Score*-Systems bestätigt werden. Auch im parietalen Cortex wurde ein neuronaler Zellverlust bei den epileptischen Tieren festgestellt (Abb. 14). Des Weiteren wurde der neuronale Zellverlust im Hilus anhand der stereologischen Zellzählung evaluiert. Auch in dieser Gehirnregion kam es zu einem epilepsieassoziierten Verlust neuronaler Zellen. Eine Behandlung mit dem PPAR γ -Agonisten konnte diese anfallsinduzierte Degeneration neuronaler Zellen nicht verhindern (Kap.V.1.5.1, Abb. 16). Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu einer früheren Studie von SUN et al. (2008). Hier führte in einem chemisch-induzierten *Status-Epilepticus*-Modell die Behandlung mit Rosiglitazon zu einer verminderten Neurodegeneration im Bereich der hippocampalen CA₁-Region (SUN et al. 2008). Dieser Effekt konnte zudem durch eine weitere Studie derselben Arbeitsgruppe bestätigt werden (YU et al. 2008). Es ist jedoch möglich, dass die verminderte Neurodegeneration in den Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe auf die akute Behandlung mit dem PPAR γ -Agonist vor dem initialen Insult (hier *Status epilepticus*) zurückzuführen ist.

Proepileptogene Insulte wie beispielsweise Traumen, Schlaganfälle, Fieberanfälle, virale Infektionen oder auch ein *Status epilepticus* führen zur Aktivierung der Mikroglia (STREIT et al. 2005). Diese klassische Aktivierung steht meist in Verbindung mit der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (TEMKIN 2009; RAVIZZA et al. 2011). Die anfallsbedingte Aktivierung der Mikroglia und die damit verbundene Hochregulation proinflammatorischer Zytokine können die neuronale Erregbarkeit steigern und zu einem neuronalen Zellverlust führen. Es wird diskutiert, dass die Konsequenzen neuroinflammatorischer Prozesse nachfolgend zur Anfallsgenerierung (Iktogenese) beitragen (TANIWAKI et al. 1996; ZIMMER et al. 1997; RIZZI et al. 2003). Neben diesem klassischen Weg gibt es auch eine alternative Aktivierungsform der Mikroglia. Diese wirkt neuroprotektiv und dient der Gewebereparatur (CZECH et al. 2011). In diesem Dissertationsvorhaben sollte die pharmakologische Beeinflussung der Mikrogliafunktion mit Begünstigung eines regenerativen Phänotyps durch Rosiglitazon untersucht werden. Es wurde geprüft, ob Rosiglitazon die

Mikrogliafunktion langfristig modulieren kann, um eine neuroprotektive und antiinflammatorische Wirkungsweise zu vermitteln. PPAR γ spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung mikroglialer Zellen (BERNARDO et al. 2000; LUNA-MEDINA et al. 2005; BERNARDO u. MINGHETTI 2006, 2008). PPAR γ -Agonisten können durch die Unterdrückung der Expression inflammatorischer Transkriptionsfaktoren neuroprotektiv und antiinflammatorisch wirken (MORAES et al. 2006). Im Rahmen dieser Studie konnte der statusinduzierte Effekt auf die Aktivierung der Mikroglia nachgewiesen werden (Abb. 20). Im Bereich des Hilus und der CA_{3c/4}-Region des Hippocampus reduzierte die Rosiglitazon-Behandlung den Grad der Aktivierung mikroglialer Zellen bei den epileptischen Tieren (Abb. 20). Dies weist darauf hin, dass die Behandlung mit Rosiglitazon in der vorliegenden Studie einen Effekt auf die Mikrogliaaktivierung besitzt. Diese Wirkung steht im Einklang mit einer früheren Studie von CARTA et al. (2011). Diese Arbeitsgruppe konnte im Parkinson-Modell eine Reduktion der Aktivierung mikroglialer Zellen durch Rosiglitazon nachweisen (CARTA et al. 2011). Auch in einem Schlaganfallmodell reduzierte Rosiglitazon die Aktivierung der Mikroglia (LEE et al. 2011). Die Resultate weisen daraufhin, dass die Behandlung mit Rosiglitazon langfristig zu einem verminderten Grad der Mikrogliaaktivierung bei epileptischen Tieren führt. Um jedoch zu prüfen, ob Rosiglitazon den Phänotyp aktivierter mikroglialer Zellen beeinflussen kann und so einen antiinflammatorischen Effekt vermittelt, wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation das von Gliazellen freigesetzte inflammatorische Zytokin IL-1 β quantifiziert (Kap. IV.1.8.2). In früheren Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass Rosiglitazon die Konzentration von IL-1 β nach Rückenmarksschädigung verringert (LI et al. 2013). Im Rahmen des vorliegenden Projekts konnte die Behandlung mit Rosiglitazon die Expression von IL-1 β jedoch dauerhaft nicht reduzieren (Kap. V.1.5.2, Abb. 17). Dabei sollte allerdings erwähnt werden, dass zwischen Absetzen der Substanz und der Probengewinnung ein Zeitraum von über drei Monaten lag. Um einen akuten Effekt von Rosiglitazon während oder kurz nach der Behandlungsphase auf die Funktionsform der aktivierten Mikroglia und die damit verbundene Freisetzung inflammatorischer Zytokine zu untersuchen, sind weitere Untersuchungen nötig.

Im Rahmen eines *Status epilepticus* kommt es zu einer gestörten neuronalen Plastizität in Form einer gesteigerten Neubildung von Neuronen (Neurogenese)

(KOKAIA 2011). Dies konnte bereits im Rahmen früherer Veröffentlichungen aus unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden (SEEGER et al. 2011; LICKO et al. 2013; RUSSMANN et al. 2013). Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war es den PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon auf eine mögliche epileptogenesemodifizierende Wirkung zu prüfen. Dabei sollte unter anderem geprüft werden, ob die Mikroglia durch Rosiglitazon dahingehend beeinflusst werden kann, dass diese zur neuroprotektiven Aktivierungsform moduliert wird. Dies führt zur Gewebereparatur des Gehirns und somit auch zur Regeneration von Neuronen (KREUTZBERG 1996; CZECH et al. 2011). In einer anderen Studie bewirkte Rosiglitazon durch die Modulation des neurotrophen Faktors BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) eine vermehrte Zellproliferation sowie eine erhöhte Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen (Neuroblasten) (YOO et al. 2013). Anhand BrdU/NeuN-gefärbter Gehirnschnitte wurde die Neurogenese im Bereich des *Gyrus dentatus* untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit Rosiglitazon zu einer gesteigerten akuten neuronalen Zellproliferation zwischen dem fünften und neunten Tag nach Induktion des *Status epilepticus* führte (Abb. 18). Durch epileptische Anfälle ist häufig eine gesteigerte Neurogenese zu beobachten (BENGZON et al. 1997; HATTIANGADY u. SHETTY 2008; KOKAIA 2011). Es gibt Hinweise, dass diese neugebildeten neuronalen Zellen unter Umständen auch prokonvulsiv wirken (SCHARFMAN et al. 2000; ZHAN et al. 2010). Es wird diskutiert, dass diese prokonvulsiv wirkende Neurogenese durch eine fehlerhafte Netzwerkintegration der neugebildeten Neurone in Verbindung mit kognitiven Defiziten steht (PARENT u. LOWENSTEIN 2002; JESSBERGER et al. 2007). Es konnte bereits in verschiedenen Studien dargestellt werden, dass diverse antiepileptische Pharmaka eine gesteigerte Neurogenese hervorrufen können (HAO et al. 2004; LAENG et al. 2004; SHANKARAN et al. 2006). Die in diesem Dissertationsvorhaben gesammelten Resultate auf eine positive Beeinflussung durch Rosiglitazon auf das Lernvermögen im *Morris Water Maze* könnten im Zusammenhang mit der durch Rosiglitazon gesteigerten Neurogenese zu stehen.

Rosiglitazon ist in der Lage den Blutglukosespiegel zu senken, indem es die Glukoseproduktion in der Leber verringert und die Insulinsensitivität steigert (WILLSON et al. 2000; WILLSON et al. 2001). Im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens wurde Rosiglitazon auf einen möglichen metabolischen

Effekt bei Ratten, die nicht an *Diabetes mellitus* Typ 2 erkrankt sind, untersucht. Die Messung des Blutglukosespiegels der Ratten wurde sowohl vor als auch am Ende der Behandlungsphase durchgeführt (Kap. IV.1.4). Die Behandlung mit Rosiglitazon beeinflusste die Blutglukosewerte der Tiere nicht (Kap. V.1.2).

2. Amygdala-Kindling-Modell

Die wiederholten Stimulationen, welche während des Amygdala-*Kindling*-Modells induziert wurden, führen zur Entstehung eines hyperexzitablen Netzwerkes sowie zu zellulären Veränderungen. Diese Veränderungen treten in vergleichbarer Weise auch bei Patienten mit Temporallappenepilepsie auf und steigern nachfolgend progressiv die Anfallsschwere und –dauer (LÖSCHER 2002). Mit Hilfe des Amygdala-*Kindling*-Modells sollten im Rahmen des vorliegenden Dissertationsvorhabens erkrankungsmodifizierende Effekte des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon evaluiert werden. Des Weiteren diene das Amygdala-*Kindling*-Modell dazu, die Auswirkungen einer Rosiglitazon-Vorbehandlung auf die Sensitivität von Phenobarbital zu untersuchen. In einer Pilotstudie wurden akute Effekte durch die Prüfung verschiedener Dosierungen ausgeschlossen (Kap. IV.2.2.3 und Kap. V.2.1). Da mit keiner Dosierung ein akuter antikonvulsiver Effekt auftrat, wurde die höchste Dosierung für den Hauptversuch verwendet.

Im Anschluss an diese Substanzversuche folgte das *Massive-Kindling*, welches eine Temporallappenepilepsie mit hoher Anfallsdichte imitiert (PEKCEC et al. 2009). Im vorliegenden Dissertationsvorhaben wurde mit Hilfe des *Massive Kindling* der PPAR γ -Agonist Rosiglitazon auf erkrankungsmodifizierende Effekte geprüft. Die Behandlung mit Rosiglitazon führte während des *Massive Kindling* zu einer reduzierten kumulativen Anfallsdauer (Abb. 21). Hinsichtlich der weiteren Anfallsparameter (*seizure severity*, mittlere *seizure severity*, Anzahl der generalisierten Anfälle) konnte jedoch kein Effekt des Rosiglitazon nachgewiesen werden. Somit besaß Rosiglitazon keinen erkrankungsmodifizierenden Effekt. Dies bestätigte sich durch eine fehlende Wirkung der Substanz auf Anfallsschwelle der Tiere, die im Anschluss an das *Massive Kindling* bestimmt wurde (Kap. IV.2.2.4).

Im Anschluss an das *Massive Kindling* wurden die Auswirkungen einer Rosiglitazon-Vorbehandlung auf die Sensitivität von Phenobarbital untersucht. Das Standardantiepileptikum Phenobarbital wurde dabei subtherapeutisch dosiert (Kap.IV.2.2.4). Durch die Rosiglitazon-Behandlung sollte die Sensitivität gegenüber Phenobarbital erhöht werden. Im Rahmen des vorliegenden Projektes konnte jedoch kein Effekt der Vorbehandlung mit dem PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon auf die Wirksamkeit von Phenobarbital nachgewiesen werden (Kap.V.2.2). Im Rahmen einer früheren Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit einem EP1-Rezeptor-Agonisten die Sensitivität von Phenobarbital steigert (PEKCEC et al. 2009). Das Ergebnis dieser Studie zeigt, dass das Amygdala-*Kindling*-Modell sehr gut geeignet ist, um die Wirksamkeit von Substanzen auf die Pharmakosensitivität von Phenobarbital zu erfassen. Obwohl der EP1-Rezeptor-Agonist auch antiinflammatorisch wirkt, könnte ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Dissertation und der Studie von PEKCEC et al. (2009) die verschiedene Wirkungsweise der verwendeten Substanzen darstellen. Der EP1-Rezeptor-Antagonist hemmt die anfallsinduzierte Hochregulierung des Efflux-Transporters P-Glykoprotein an der Blut-Hirn-Schranke. Dies führt nachfolgend zu einer erhöhten Wirksamkeit antiepileptischer Medikamente (PEKCEC et al. 2009). Ein möglicher Einfluss von Rosiglitazon auf das P-Glykoprotein ist jedoch nicht auszuschließen.

Zusammenfassend weisen die erhobenen Daten darauf hin, dass die Behandlung mit Rosiglitazon im Substanzversuch erwartungsgemäß keinen akuten Effekt aufwies. Des Weiteren konnte im Rahmen des *Massive Kindling* kein erkrankungsmodifizierender Effekt von Rosiglitazon nachgewiesen werden. Auch die Sensitivität des Standardantiepileptikum Phenobarbital konnte durch den PPAR γ -Agonisten nicht beeinflusst werden.

In früheren Studien konnte nachgewiesen werden, dass der Prozess des *Kindlings* bei vollgekindelten Tieren zur Ausbildung eines hyperexzitatorischen Netzwerkes im Gehirn sowie zu zahlreichen zellulären und molekularen Veränderungen führt (LÖSCHER 2002; PEKCEC et al. 2009; ZELLINGER et al. 2014). Um mögliche akute zelluläre und molekulare Effekte von Rosiglitazon im Amygdala-*Kindling*-Modell zu überprüfen, sind weiterführende immunhistochemische Untersuchungen sind nötig.

3. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieses Dissertationsvorhabens zeigen, dass der PPAR γ -Agonist Rosiglitazon dauerhafte Effekte auf zellulärer Ebene zu vermitteln vermag. Weitere Untersuchungen werden jedoch nötig sein, um die akute antiinflammatorische sowie neuroprotektive Wirksamkeit von Rosiglitazon auf molekularer und zellulärer Ebene detailliert zu prüfen und die zugrundeliegenden Mechanismen zu klären. Auch auf die Lernleistung epileptischer Tiere scheint Rosiglitazon bei dieser Studie einen positiven Einfluss vermittelt zu haben. Des Weiteren konnte Rosiglitazon die Gedächtnisleistung von gesunden Kontrolltieren verbessern. Daher könnte der PPAR γ -Agonist in Zukunft möglicherweise zur verbesserten Gedächtnisleistung beim gesunden Menschen und auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen beitragen. Um diese Ergebnisse weiter zu bekräftigen, sind weiterführende Lern- und Gedächtnisuntersuchungen an verschiedenen Spezies nötig.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Katharina Boes

Untersuchung erkrankungsmodifizierender und antiepileptogener Effekte eines PPAR γ -Agonisten in chronischen Epilepsiemodellen

Epilepsieerkrankungen werden bei Hund und Katze sowie beim Menschen häufig diagnostiziert. Mögliche Therapiemaßnahmen beschränken sich leider bisher auf eine symptomatische Behandlung in Form der Anfallskontrolle. Hierfür ist oft eine lebenslange Medikation mit antiepileptischen Pharmaka unumgänglich. Bei circa einem Drittel der Patienten führt jedoch auch die medikamentöse Behandlung zu keiner Besserung. Die Epilepsie dieser Patienten wird als pharmakoresistent eingestuft. Des Weiteren kann die Lebensqualität der Patienten durch die mit der Epilepsieerkrankung assoziierten psychiatrischen Komorbiditäten stark eingeschränkt sein. Die Entstehung symptomatischer Epilepsien ist auf einen initialen Insult wie beispielsweise Schädelhirntraumen oder Infektionen zurückzuführen. Wünschenswert wäre daher die Entwicklung präventiver Maßnahmen, die den Prozess der Epilepsieentstehung (Epileptogenese) als Folge initialer Insulte dahingehend beeinflussen können, dass dieser abgemildert oder bestenfalls verhindert wird. Neuroinflammatorische Prozesse und die damit assoziierte Aktivierung der Mikrogliazellpopulation scheinen mitverantwortlich für die Entstehung von Epilepsien zu sein. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass durch die Aktivierung des von Mikrogliazellen exprimierten Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor gamma (PPAR γ) eine antiinflammatorische Wirkungsweise vermittelt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon auf die Epileptogenese anhand von zwei chronischen Epilepsiemodellen, dem *Post-Status-Epilepticus*-Modell und dem *Amygdala-Kindling*-Modell, untersucht. Des Weiteren wurden Effekte von Rosiglitazon auf epilepsieassoziierte Verhaltensänderungen, kognitive Defizite sowie Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene evaluiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der PPAR γ -Agonist Rosiglitazon im *Post-Status-Epilepticus*-Modell im Bereich des Hilus und der *Cornu ammonis*-Region 3c/4 des Hippocampus die Aktivierung mikroglialer

Zellen langfristig zu reduzieren vermag. Der Aktivierung mikroglialer Zellen wird im Rahmen der Epilepsieentstehung eine wichtige Bedeutung zugeschrieben. Auf Grund dessen ist anzunehmen, dass eine Therapie mit Rosiglitazon auch Auswirkungen auf die Manifestation einer Epilepsieerkrankung besitzt. Des Weiteren wurden in dem vorliegenden Dissertationsvorhaben Effekte einer Rosiglitazon-Behandlung auf das Auftreten spontaner epileptischer Anfälle untersucht. Es zeigte sich jedoch, dass eine Behandlung mit dem PPAR γ -Agonisten im chronischen Epilepsiemodell keinen Effekt auf die Manifestation chronisch auftretender Anfälle und somit in dieser Studie keinen antiepileptogenen Effekt besaß. Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit Rosiglitazon auf eine langanhaltende antiinflammatorische Wirkung untersucht, indem die Expression des Zytokins Interleukin-1 beta evaluiert wurde. Eine transiente Behandlung mit Rosiglitazon konnte die Expression dieses inflammatorischen Zytokins jedoch nicht dauerhaft vermindern. In Bezug auf die statusassoziierte neuronale Plastizität bewirkte die Behandlung mit Rosiglitazon eine vermehrte Neuronenneubildung (Neurogenese) im Bereich des hippocampalen *Gyrus dentatus*. Der statusinduzierte neuronale Zellverlust konnte durch die Behandlung mit dem PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon langfristig jedoch nicht vermindert werden. Im Rahmen der Erfassung des räumlichen Lern- und Gedächtnisvermögens durch die Verhaltensuntersuchungen im *Morris Water Maze* (Wasserlabyrinth) konnte Rosiglitazon die Lernleistung epileptischer Tiere positiv beeinflussen. Zudem wurde ein verbessertes räumliches Gedächtnisvermögen Rosiglitazon-behandelter gesunder Kontrolltiere nachgewiesen. Angstassoziierte Verhaltensweisen wurden durch die Behandlung mit Rosiglitazon nicht beeinflusst.

Im Rahmen des Amygdala-*Kindling*-Modells konnten weder akute noch erkrankungsmodifizierende Effekte von Rosiglitazon nachgewiesen werden. Des Weiteren beeinflusste die Rosiglitazon-Vorbehandlung nicht die Sensitivität gegenüber dem Standardantiepileptikum Phenobarbital.

Zusammenfassend sprechen einige Ergebnisse des *Post-Status-Epilepticus*-Modells für eine erkrankungsmodifizierende Wirkung des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon. Ein antiepileptogener Effekt durch Rosiglitazon konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Ausblickend wäre es sinnvoll Rosiglitazon auf einen akuten antiinflammatorischen und neuroprotektiven Effekt während oder kurz

nach der Behandlung zu prüfen. Dafür wären jedoch weitere immunhistochemische Untersuchungen notwendig. Die vorliegende Arbeit konnte darstellen, dass die Behandlung mit Rosiglitazon zu einer verbesserten Gedächtnisleistung bei gesunden Kontrolltieren führt. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wären weiterführende Lern- und Gedächtnisuntersuchungen bei gesunden Kontrolltieren nötig.

VIII. SUMMARY

Katharina Boes

Investigation of disease-modifying and antiepileptic effects by a PPAR γ -agonist in chronic epilepsy models

Epileptic diseases are often diagnosed in dogs and cats as well as in humans. Current antiepileptic therapy methods are unfortunately limited to the symptomatic therapy of seizure control. Therefore, often the only treatment option is lifelong medication with antiepileptic drugs. However, approximately one third of all patients do not show improvement upon pharmaceutical therapy. Due to the pharmacoresistance of their epilepsy, these patients' quality of life may also suffer. Disease-associated comorbidities can arise as a result of unresponsiveness to antiepileptic drugs. The ideal treatment of epilepsy would thus be a prophylactic therapy, which would attenuate or ultimately prevent disease progression. Since the development of symptomatic epilepsy may be traced back to an initial insult, e.g. a brain injury or infection, there is the opportunity to modulate the process of epileptogenesis immediately following such an insult. Neuroinflammatory processes and the associated activation of microglia have been implicated in the origin of epilepsies. There are indications, that the activation of the peroxisome-proliferator-receptor gamma (PPAR γ), which is expressed by microglia, contributes to an anti-inflammatory effect. In this study the impact of the PPAR γ -agonist rosiglitazone on epileptogenesis was investigated in two chronic epilepsy models, the post-status-epilepticus-model and the amygdala-kindling-model. Furthermore, the effects of rosiglitazone on epilepsy-associated changes in behavior and cognition as well as cellular and molecular alterations in the epileptic network were evaluated.

The results of this study indicate that rosiglitazone was able to decrease long-term activation of microglia in the hilus and the *cornu ammonis*-region 3c/4 of the hippocampus in the post-status-epilepticus-model. With the knowledge that activation of microglial cells is important for the epileptogenic process it was supposed that rosiglitazone could influence the development of a hyperexcitable epileptic network in the brain. Therefore, the effect of rosiglitazone on the subsequent development of spontaneous seizures was also evaluated. There was

no observable effect on chronic seizure generation, thus discouraging the possibility of an antiepileptic impact via rosiglitazone treatment in this chronic epilepsy model. The long-term anti-inflammatory effect of rosiglitazone was also investigated through evaluation of the expression of an inflammatory marker cytokine interleukin-1 beta (IL-1 β). We found out that transient therapy with rosiglitazone did not reduce IL-1 β expression in comparison with non-treated epileptic subjects. During the investigation of status-associated neuronal plasticity, the treatment with rosiglitazone increased the generation of newborn neurons (neurogenesis) in the area of the hippocampal dentate gyrus. A long-lasting prevention of status-induced neuronal cell loss was not, however, evident. Additionally, the Morris water maze behavioral test (water labyrinth) of spatial learning and memory indicated that rosiglitazone had a positive impact on the spatial learning of epileptic animals. Furthermore, improved spatial memory was demonstrated in rosiglitazone-treated control animals. Rosiglitazone did not influence the anxiety-associated behavior commonly seen in epileptic animals.

In the amygdala-kindling-model neither acute nor disease-modifying effects of rosiglitazone could be found. Moreover, the pre-treatment with rosiglitazone could not influence the sensitivity of the standard antiepileptic drug phenobarbital.

In conclusion, several results of the post-status-epilepticus-model indicate a disease-modifying effect of the PPAR γ -agonist rosiglitazone. An antiepileptic effect was not, however, proven. Furthermore, it would be useful to evaluate rosiglitazone in epileptic animals during or shortly after treatment for acute anti-inflammatory and neuroprotective effects. For this purpose, further immunohistochemical investigations would be necessary. In terms of behavioral modification, this study could demonstrate that treatment with rosiglitazone improves spatial memory of healthy control animals. Further tests of learning and memory on healthy animals would be necessary to confirm this result.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

ABBATECOLA, A. M., F. LATTANZIO, A. M. MOLINARI, M. CIOFFI, L. MANSI, P. RAMBALDI, L. DICIOCCIO, F. CACCIAPUOTI, R. CANONICO u. G. PAOLISSO (2010):

Rosiglitazone and cognitive stability in older individuals with type 2 diabetes and mild cognitive impairment.

Diabetes care 33, 1706-1711

ACARIN, L., H. PELUFFO, B. GONZALEZ u. B. CASTELLANO (2002):

Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 after excitotoxic damage to the immature rat brain.

Journal of neuroscience research 68, 745-754

AJAMI, B., J. L. BENNETT, C. KRIEGER, W. TETZLAFF u. F. M. ROSSI (2007):

Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life.

Nature neuroscience 10, 1538-1543

AJMONE-CAT, A. M., L. M. SALVATORI, R. DE SIMONE, M. MANCINI, S. BIAGIONI, A. BERNARDO, E. CACCI u. L. MINGHETTI (2012):

Docosahexaenoic acid modulates inflammatory and antineurogenic functions of activated microglial cells.

Journal of neuroscience research 90, 575-587

ALEMAN, M., L. C. GRAY, D. C. WILLIAMS, T. A. HOLLIDAY, J. E. MADIGAN, R. A. LECOUEUR u. K. G. MAGDESIAN (2006):

Juvenile idiopathic epilepsy in Egyptian Arabian foals: 22 cases (1985-2005).

Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine 20, 1443-1449

ALI, D. W. u. M. W. SALTER (2001):

NMDA receptor regulation by Src kinase signalling in excitatory synaptic transmission and plasticity.

Current opinion in neurobiology 11, 336-342

ALLAHTAVAKOLI, M., A. SHABANZADEH, A. ROOHBAKHSH u. A. POURSHANAZARI (2007):

Combination therapy of rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, and NMDA receptor antagonist (MK-801) on experimental embolic stroke in rats.

Basic & clinical pharmacology & toxicology 101, 309-314

ALTMAN, J. u. G. D. DAS (1965):

Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats.

The Journal of comparative neurology 124, 319-335

ANDRES-MACH, M., J. R. FIKE u. J. J. LUSZCZKI (2011):

Neurogenesis in the epileptic brain: a brief overview from temporal lobe epilepsy.

Pharmacological reports : PR 63, 1316-1323

ANNEGERS, J. F., W. A. ROCCA u. W. A. HAUSER (1996):

Causes of epilepsy: contributions of the Rochester epidemiology project.

Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic 71, 570-575

BALDWIN, S. J., S. E. CLARKE u. R. J. CHENERY (1999):

Characterization of the cytochrome P450 enzymes involved in the in vitro metabolism of rosiglitazone.

British journal of clinical pharmacology 48, 424-432

BARAN, H., M. GRAMER, D. HONACK u. W. LOSCHER (1995):

Systemic administration of kainate induces marked increases of endogenous kynurenic acid in various brain regions and plasma of rats.

European journal of pharmacology 286, 167-175

BEN-ARI, Y. (1985):

Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy.

Neuroscience 14, 375-403

BENGZON, J., Z. KOKAIA, E. ELMER, A. NANOBASHVILI, M. KOKAIA u. O. LINDVALL (1997):

Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent

limbic seizures.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 10432-10437

BENVENISTE, E. N. (1992):

Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action.

The American journal of physiology 263, C1-16

BERG, A. T., S. F. BERKOVIC, M. J. BRODIE, J. BUCHHALTER, J. H. CROSS, W. VAN EMDE BOAS, J. ENGEL, J. FRENCH, T. A. GLAUSER, G. W. MATHERN, S. L. MOSHE, D. NORDLI, P. PLOUIN u. I. E. SCHEFFER (2010):

Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009.

Epilepsia 51, 676-685

BERGIN, P. S., P. J. THOMPSON, S. A. BAXENDALE, D. R. FISH u. S. D. SHORVON (2000):

Remote memory in epilepsy.

Epilepsia 41, 231-239

BERNARDO, A., G. LEVI u. L. MINGHETTI (2000):

Role of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) and its natural ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2 in the regulation of

microglial functions.

The European journal of neuroscience 12, 2215-2223

BERNARDO, A. u. L. MINGHETTI (2006):

PPAR-gamma agonists as regulators of microglial activation and brain inflammation.

Current pharmaceutical design 12, 93-109

BERNARDO, A. u. L. MINGHETTI (2008):

Regulation of Glial Cell Functions by PPAR-gamma Natural and Synthetic Agonists.

PPAR research 2008, 864140

BERNASCONI, N., A. BERNASCONI, Z. CARAMANOS, S. B. ANTEL, F. ANDERMANN u. D. L. ARNOLD (2003):

Mesial temporal damage in temporal lobe epilepsy: a volumetric MRI study of the hippocampus, amygdala and parahippocampal region.

Brain : a journal of neurology 126, 462-469

BIALER, M. u. H. S. WHITE (2010):

Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs.

Nature reviews. Drug discovery 9, 68-82

BLOCK, M. L., L. ZECCA u. J. S. HONG (2007):

Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms.

Nature reviews. Neuroscience 8, 57-69

BLUMCKE, I., R. CORAS, H. MIYATA u. C. OZKARA (2012):

Defining clinico-neuropathological subtypes of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis.

Brain Pathol 22, 402-411

BLUMCKE, I., M. THOM u. O. D. WIESTLER (2002):

Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy.

Brain Pathol 12, 199-211

BLUMSTEIN, L. K. u. J. N. CRAWLEY (1983):

Further characterization of a simple, automated exploratory model for the anxiolytic effects of benzodiazepines.

Pharmacology, biochemistry, and behavior 18, 37-40

BRANDEIS, R., Y. BRANDYS u. S. YEHUDA (1989):

The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning.

The International journal of neuroscience 48, 29-69

BRANDT, C., A. M. GASTENS, M. SUN, M. HAUSKNECHT u. W. LOSCHER (2006):

Treatment with valproate after status epilepticus: effect on neuronal damage, epileptogenesis, and behavioral alterations in rats.

Neuropharmacology 51, 789-804

BRANDT, C., M. GLIEN, H. POTSCHKA, H. VOLK u. W. LOSCHER (2003):

Epileptogenesis and neuropathology after different types of status epilepticus induced by prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala in rats.

Epilepsy research 55, 83-103

BROCKHAUS, J., S. ILSCHNER, R. B. BANATI u. H. KETTENMANN (1993):

Membrane properties of ameboid microglial cells in the corpus callosum slice from early postnatal mice.

The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 13, 4412-4421

BROWNE, T. R. u. G. L. HOLMES (2001):

Epilepsy.

The New England journal of medicine 344, 1145-1151

CAMERON, H. A., C. S. WOOLLEY, B. S. MCEWEN u. E. GOULD (1993):

Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat.

Neuroscience 56, 337-344

CARTA, A. R., L. FRAU, A. PISANU, J. WARDAS, S. SPIGA u. E. CARBONI (2011):

Rosiglitazone decreases peroxisome proliferator receptor-gamma levels in microglia and inhibits TNF-alpha production: new evidences on neuroprotection in a progressive Parkinson's disease model.

Neuroscience 194, 250-261

CARTA, A. R. u. A. PISANU (2013):

Modulating microglia activity with PPAR-gamma agonists: a promising therapy for Parkinson's disease?

Neurotoxicity research 23, 112-123

CAVANAGH, J. B. u. A. MEYER (1956):

Aetiological aspects of Ammon's horn sclerosis associated with temporal lobe epilepsy.

British medical journal 2, 1403-1407

CAVAZOS, J. E., S. M. JONES u. D. J. CROSS (2004):

Sprouting and synaptic reorganization in the subiculum and CA1 region of the hippocampus in acute and chronic models of partial-onset epilepsy.

Neuroscience 126, 677-688

CELINSKI, K., T. DWORZANSKI, R. FORMAL, A. KOROLCZUK, A. MADRO u. M. SLOMKA (2012):

Comparison of the anti-inflammatory and therapeutic actions of PPAR-gamma

agonists rosiglitazone and troglitazone in experimental colitis.

Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society 63, 631-640

CHAN, W. Y., S. KOHSAKA u. P. REZAIE (2007):

The origin and cell lineage of microglia: new concepts.

Brain research reviews 53, 344-354

CHANG, B. S. u. D. H. LOWENSTEIN (2003):

Epilepsy.

The New England journal of medicine 349, 1257-1266

CHAOULOFF, F., M. DURAND u. P. MORMEDE (1997):

Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests.

Behavioural brain research 85, 27-35

CHIQUELLE, E., G. RAMIREZ u. R. DEFRONZO (2004):

A meta-analysis comparing the effect of thiazolidinediones on cardiovascular risk factors.

Archives of internal medicine 164, 2097-2104

CHUANG, Y. C., T. K. LIN, H. Y. HUANG, W. N. CHANG, C. W. LIOU, S. D. CHEN, A. Y. CHANG u. S. H. CHAN (2012):

Peroxisome proliferator-activated receptors gamma/mitochondrial uncoupling protein 2 signaling protects against seizure-induced neuronal cell death in the hippocampus following experimental status epilepticus.

Journal of neuroinflammation 9, 184

COLTON, C. u. D. M. WILCOCK (2010):

Assessing activation states in microglia.

CNS & neurological disorders drug targets 9, 174-191

COSTALL, B., B. J. JONES, M. E. KELLY, R. J. NAYLOR u. D. M. TOMKINS (1989):

Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety.

Pharmacology, biochemistry, and behavior 32, 777-785

CRABBE, J. C. (1986):

Genetic differences in locomotor activation in mice.

Pharmacology, biochemistry, and behavior 25, 289-292

CRAWLEY, J. u. F. K. GOODWIN (1980):

Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines.

Pharmacology, biochemistry, and behavior 13, 167-170

CRAWLEY, J. N. (1981):

Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines.

Pharmacology, biochemistry, and behavior 15, 695-699

CRESPEL, A., V. RIGAU, P. COUBES, M. C. ROUSSET, F. DE BOCK, H. OKANO, M. BALDY-MOULINIER, J. BOCKAERT u. M. LERNER-NATOLI (2005):

Increased number of neural progenitors in human temporal lobe epilepsy.

Neurobiology of disease 19, 436-450

CURRIE, S., K. W. HEATHFIELD, R. A. HENSON u. D. F. SCOTT (1971):

Clinical course and prognosis of temporal lobe epilepsy. A survey of 666 patients.

Brain : a journal of neurology 94, 173-190

CZECH, M., P. GRESSENS u. A. M. KAINDL (2011):

The yin and yang of microglia.

Developmental neuroscience 33, 199-209

D'HOOGHE, R. u. P. P. DE DEYN (2001):

Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory.

Brain research. Brain research reviews 36, 60-90

DAYNES, R. A. u. D. C. JONES (2002):

Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity.

Nature reviews. Immunology 2, 748-759

DEPAULIS, A., V. HELFER, C. DERANSART u. C. MARESCAUX (1997):

Anxiogenic-like consequences in animal models of complex partial seizures.

Neuroscience and biobehavioral reviews 21, 767-774

DESERGNE, B. u. W. WAHLI (1999):

Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism.

Endocrine reviews 20, 649-688

DIOP, A. G., H. M. DE BOER, C. MANDLHATE, L. PRILIPKO u. H. MEINARDI (2003):

The global campaign against epilepsy in Africa.

Acta tropica 87, 149-159

DREIFUSS, F. E. (1994):

New antiepileptic drug development.

Epilepsia 35 Suppl 5, S6-9

DUBINSKY, J. M. (1993):

Intracellular calcium levels during the period of delayed excitotoxicity.

The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience
13, 623-631

DUMAN, R. S. (2009):

Neuronal damage and protection in the pathophysiology and treatment of psychiatric illness: stress and depression.

Dialogues in clinical neuroscience 11, 239-255

EKDAHL, C. T. (2012):

Microglial activation - tuning and pruning adult neurogenesis.

Frontiers in pharmacology 3, 41

ELKABES, S., E. M. DICICCO-BLOOM u. I. B. BLACK (1996):

Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function.

The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience
16, 2508-2521

ENGEL, J., JR. (1996):

Clinical evidence for the progressive nature of epilepsy.

Epilepsy research. Supplement 12, 9-20

ENGEL, J., JR. (2001):

A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with

epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology.

Epilepsia 42, 796-803

ENGEL, T., C. K. SCHINDLER, A. SANZ-RODRIGUEZ, R. M. CONROY, R. MELLER, R. P. SIMON u. D. C. HENSHALL (2011):

Expression of neurogenesis genes in human temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis.

International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology 3, 38-47

ESCHER, P., O. BRAISSANT, S. BASU-MODAK, L. MICHALIK, W. WAHLI u. B. DESVERGNE (2001):

Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding.

Endocrinology 142, 4195-4202

ESCRIBANO, L., A. M. SIMON, E. GIMENO, M. CUADRADO-TEJEDOR, R. LOPEZ DE MATURANA, A. GARCIA-OSTA, A. RICOBARAZA, A. PEREZ-MEDIAVILLA, J. DEL RIO u. D. FRECHILLA (2010):

Rosiglitazone rescues memory impairment in Alzheimer's transgenic mice: mechanisms involving a reduced amyloid and tau pathology.

Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 35, 1593-1604

ESPOSITO, E., V. DI MATTEO, A. BENIGNO, M. PIERUCCI, G. CRESCIMANNO u. G. DI GIOVANNI (2007):

Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease.

Experimental neurology 205, 295-312

FALCONER, M. A. u. D. C. TAYLOR (1968):

Surgical treatment of drug-resistant epilepsy due to mesial temporal sclerosis.
Etiology and significance.

Archives of neurology 19, 353-361

FANG, M., Z. Q. XI, Y. WU u. X. F. WANG (2011):

A new hypothesis of drug refractory epilepsy: neural network hypothesis.

Medical hypotheses 76, 871-876

FARIELLO, R. G., G. T. GOLDEN, G. G. SMITH u. P. F. REYES (1989):

Potentiation of kainic acid epileptogenicity and sparing from neuronal damage by
an NMDA receptor antagonist.

Epilepsy research 3, 206-213

FEIGE, J. N., L. GELMAN, C. TUDOR, Y. ENGELBORGHES, W. WAHLI u. B.
DESVERGNE (2005):

Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-
activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of
ligand.

The Journal of biological chemistry 280, 17880-17890

FISHER, P. D., E. F. SPERBER u. S. L. MOSHE (1998):

Hippocampal sclerosis revisited.

Brain & development 20, 563-573

FISHER, R. S., W. VAN EMDE BOAS, W. BLUME, C. ELGER, P. GENTON,
P. LEE u. J. ENGEL, JR. (2005):

Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League
Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE).

Epilepsia 46, 470-472

FORSGREN, L. u. L. NYSTROM (1990):

An incident case-referent study of epileptic seizures in adults.

Epilepsy research 6, 66-81

GAGE, F. H. (2002):

Neurogenesis in the adult brain.

The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience
22, 612-613

GILBERT, M. E., B. J. GILLIS u. D. P. CAIN (1984):

Kindling in the cortical nucleus of the amygdala.

Brain research 295, 360-363

GILLIAM, F. G. u. B. ALBERTSON (2011):

Identifying epilepsy surgery candidates in the outpatient clinic.

Epilepsy & behavior : E&B 20, 156-159

GODDARD, G. V., D. C. MCINTYRE u. C. K. LEECH (1969):

A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation.

Experimental neurology 25, 295-330

GOLD, M., C. ALDERTON, M. ZVARTAU-HIND, S. EGGINTON, A. M. SAUNDERS, M. IRIZARRY, S. CRAFT, G. LANDRETH, U. LINNAMAGI u. S. SAWCHAK (2010a):

Rosiglitazone monotherapy in mild-to-moderate Alzheimer's disease: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study.

Dementia and geriatric cognitive disorders 30, 131-146

GOLD, M., C. ALDERTON, M. ZVARTAU-HIND, S. EGGINTON, A. M. SAUNDERS, M. IRIZARRY, S. CRAFT, G. LANDRETH, U. LINNAMAGI u. S. SAWCHAK (2010b):

Rosiglitazone Monotherapy in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease: Results from a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase III Study.

Dementia and geriatric cognitive disorders 30, 131-146

GORDON, S. (2003):

Alternative activation of macrophages.

Nature reviews. Immunology 3, 23-35

GRAEBER, M. B. u. W. J. STREIT (2010):

Microglia: biology and pathology.

Acta neuropathologica 119, 89-105

HAAS, S., J. BROCKHAUS, A. VERKHRATSKY u. H. KETTENMANN
(1996):

ATP-induced membrane currents in ameboid microglia acutely isolated from mouse brain slices.

Neuroscience 75, 257-261

HALL, C. S. (1934):

Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual

differences in emotionality.

Journal of Comparative Psychology 18(3), 385-403

HAMID, H., A. B. ETTINGER u. M. MULA (2011):

Anxiety symptoms in epilepsy: salient issues for future research.

Epilepsy & behavior : E&B 22, 63-68

HANDLEY, S. L. u. J. W. MCBLANE (1993):

An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs.

Journal of pharmacological and toxicological methods 29, 129-138

HANDLEY, S. L. u. S. MITHANI (1984):

Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour.

Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology 327, 1-5

HANYU, H., T. SATO, A. KIUCHI, H. SAKURAI u. T. IWAMOTO (2009):

Pioglitazone improved cognition in a pilot study on patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment with diabetes mellitus.

Journal of the American Geriatrics Society 57, 177-179

HAO, Y., T. CRESO, L. ZHANG, P. LI, F. DU, P. YUAN, T. D. GOULD, H. K. MANJI u. G. CHEN (2004):

Mood stabilizer valproate promotes ERK pathway-dependent cortical neuronal growth and neurogenesis.

The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 24, 6590-6599

HARRINGTON, C., S. SAWCHAK, C. CHIANG, J. DAVIES, C. DONOVAN, A. M. SAUNDERS, M. IRIZARRY, B. JETER, M. ZVARTAU-HIND, C. H. VAN DYCK u. M. GOLD (2011):

Rosiglitazone does not improve cognition or global function when used as adjunctive therapy to AChE inhibitors in mild-to-moderate Alzheimer's disease: two phase 3 studies.

Current Alzheimer research 8, 592-606

HASTINGS, N. B. u. E. GOULD (1999):

Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells.

The Journal of comparative neurology 413, 146-154

HATTIANGADY, B. u. A. K. SHETTY (2008):

Implications of decreased hippocampal neurogenesis in chronic temporal lobe epilepsy.

Epilepsia 49 Suppl 5, 26-41

HAUSER, W. A., J. F. ANNEGERS u. L. T. KURLAND (1993):

Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984.

Epilepsia 34, 453-468

HECIMOVIC, H., J. SALPEKAR, A. M. KANNER u. J. J. BARRY (2011):

Suicidality and epilepsy: a neuropsychobiological perspective.

Epilepsy & behavior : E&B 22, 77-84

HENEKA, M. T. u. G. E. LANDRETH (2007):

PPARs in the brain.

Biochimica et biophysica acta 1771, 1031-1045

HENKIN, Y., M. SADEH, S. KIVITY, E. SHABTAI, L. KISHON-RABIN u. N. GADOTH (2005):

Cognitive function in idiopathic generalized epilepsy of childhood.

Developmental medicine and child neurology 47, 126-132

HERMANN, B. P., S. DIKMEN, M. S. SCHWARTZ u. W. E. KARNES (1982):

Interictal psychopathology in patients with ictal fear: a quantitative investigation.

Neurology 32, 7-11

HESDORFFER, D. C., W. A. HAUSER, E. OLAFSSON, P. LUDVIGSSON u. O. KJARTANSSON (2006):

Depression and suicide attempt as risk factors for incident unprovoked seizures.

Annals of neurology 59, 35-41

HESDORFFER, D. C., P. LUDVIGSSON, W. A. HAUSER, E. OLAFSSON u. O. KJARTANSSON (2007):

Co-occurrence of major depression or suicide attempt with migraine with aura and risk for unprovoked seizure.

Epilepsy research 75, 220-223

HEVENER, A. L., J. M. OLEFSKY, D. REICHART, M. T. NGUYEN, G. BANDYOPADYHAY, H. Y. LEUNG, M. J. WATT, C. BENNER, M. A. FEBBRAIO, A. K. NGUYEN, B. FOLIAN, S. SUBRAMANIAM, F. J.

GONZALEZ, C. K. GLASS u. M. RICOTE (2007):

Macrophage PPAR gamma is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones.

The Journal of clinical investigation 117, 1658-1669

HICKEY, W. F. (1991):

Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation.

Brain Pathol 1, 97-105

HITIRIS, N., R. MOHANRAJ, J. NORRIE, G. J. SILLS u. M. J. BRODIE (2007):

Predictors of pharmaco-resistant epilepsy.

Epilepsy research 75, 192-196

HOLOPAINEN, I. E. (2008):

Seizures in the developing brain: cellular and molecular mechanisms of neuronal damage, neurogenesis and cellular reorganization.

Neurochemistry international 52, 935-947

HONCHAR, M. P., J. W. OLNEY u. W. R. SHERMAN (1983):

Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats.

Science 220, 323-325

HONG, S., Y. XIN, W. HAIQIN, Z. GUILIAN, Z. RU, Z. SHUQIN, W. HUQING, Y. LI, B. NING u. L. YONGNAN (2013):

The PPARgamma agonist rosiglitazone prevents neuronal loss and attenuates development of spontaneous recurrent seizures through BDNF/TrkB signaling following pilocarpine-induced status epilepticus.

Neurochemistry international 63, 405-412

HONG, S., Y. XIN, W. HAIQIN, Z. GUILIAN, Z. RU, Z. SHUQIN, W. HUQING, Y. LI u. D. YUN (2012):

The PPARgamma agonist rosiglitazone prevents cognitive impairment by inhibiting astrocyte activation and oxidative stress following pilocarpine-induced status epilepticus.

Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology 33, 559-566

HSU, D. (2007):

The dentate gyrus as a filter or gate: a look back and a look ahead.

Progress in brain research 163, 601-613

HYONG, A., V. JADHAV, S. LEE, W. TONG, J. ROWE, J. H. ZHANG u. J. TANG (2008):

Rosiglitazone, a PPAR gamma agonist, attenuates inflammation after surgical brain injury in rodents.

Brain research 1215, 218-224

IJPENBERG, A., E. JEANNIN, W. WAHLI u. B. DESVERGNE (1997):

Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element.

The Journal of biological chemistry 272, 20108-20117

INESTROSA, N. C., J. A. GODOY, R. A. QUINTANILLA, C. S. KOENIG u. M. BRONFMAN (2005):

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is expressed in hippocampal neurons and its activation prevents beta-amyloid neurodegeneration: role of Wnt signaling.

Experimental cell research 304, 91-104

JACK, C., F. RUFFINI, A. BAR-OR u. J. P. ANTEL (2005):

Microglia and multiple sclerosis.

Journal of neuroscience research 81, 363-373

JACOBS, M. P., G. G. LEBLANC, A. BROOKS-KAYAL, F. E. JENSEN, D. H. LOWENSTEIN, J. L. NOEBELS, D. D. SPENCER u. J. W. SWANN (2009):

Curing epilepsy: progress and future directions.

Epilepsy & behavior : E&B 14, 438-445

JANKOWSKY, J. L. u. P. H. PATTERSON (2001):

The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae.

Progress in neurobiology 63, 125-149

JEFFERYS, J. G. (1999):

Hippocampal sclerosis and temporal lobe epilepsy: cause or consequence?

Brain : a journal of neurology 122 (Pt 6), 1007-1008

JESSBERGER, S., K. NAKASHIMA, G. D. CLEMENSON, JR., E. MEJIA, E. MATHEWS, K. URE, S. OGAWA, C. M. SINTON, F. H. GAGE u. J. HSIEH (2007):

Epigenetic modulation of seizure-induced neurogenesis and cognitive decline.

The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 27, 5967-5975

JIN, J., J. ALBERTZ, Z. GUO, Q. PENG, G. RUDOW, J. C. TRONCOSO, C. A. ROSS u. W. DUAN (2013):

Neuroprotective effects of PPAR-gamma agonist rosiglitazone in N171-82Q mouse model of Huntington's disease.

Journal of neurochemistry 125, 410-419

JOHNSON, E. K., J. E. JONES, M. SEIDENBERG u. B. P. HERMANN (2004):

The relative impact of anxiety, depression, and clinical seizure features on health-related quality of life in epilepsy.

Epilepsia 45, 544-550

JONES, D. C., B. M. MANNING u. R. A. DAYNES (2002):

A role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha in T-cell physiology and ageing immunobiology.

The Proceedings of the Nutrition Society 61, 363-369

JUTILA, L., A. IMMONEN, K. PARTANEN, J. PARTANEN, E. MERVAALA, A. YLINEN, I. ALAFUZZOFF, L. PALJARVI, K. KARKOLA, M. VAPALAHTI u. A. PITKANEN (2002):

Neurobiology of epileptogenesis in the temporal lobe.

Advances and technical standards in neurosurgery 27, 5-22

KAPLAN, M. S. u. D. H. BELL (1984):

Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus.

The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 4, 1429-1441

KERSTEN, S. u. W. WAHLI (2000):

Peroxisome proliferator activated receptor agonists.

Exs 89, 141-151

KETTENMANN, H., U. K. HANISCH, M. NODA u. A. VERKHURATSKY (2011):

Physiology of microglia.

Physiological reviews 91, 461-553

KEUKER, J. I., G. K. VOLLMANN-HONSDORF u. E. FUCHS (2001):

How to use the optical fractionator: an example based on the estimation of neurons in the hippocampal CA1 and CA3 regions of tree shrews.

Brain research. Brain research protocols 7, 211-221

KHALAF, K. I. u. H. TAEGTMEYER (2012):

After avandia: the use of antidiabetic drugs in patients with heart failure.

Texas Heart Institute journal / from the Texas Heart Institute of St. Luke's Episcopal Hospital, Texas Children's Hospital 39, 174-178

KHARATISHVILI, I. u. A. PITKANEN (2010):

Posttraumatic epilepsy.

Current opinion in neurology 23, 183-188

KIAEI, M., K. KIPIANI, J. CHEN, N. Y. CALINGASAN u. M. F. BEAL (2005):

Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist extends survival in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.

Experimental neurology 191, 331-336

KLIEWER, S. A., K. UMESONO, D. J. NOONAN, R. A. HEYMAN u. R. M. EVANS (1992):

Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors.

Nature 358, 771-774

KNOWLES, K. (1998):

Idiopathic epilepsy.

Clinical techniques in small animal practice 13, 144-151

KODERA, Y., K. TAKEYAMA, A. MURAYAMA, M. SUZAWA, Y. MASUHIRO u. S. KATO (2000):

Ligand type-specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators.

The Journal of biological chemistry 275, 33201-33204

KOKAIA, M. (2011):

Seizure-induced neurogenesis in the adult brain.

The European journal of neuroscience 33, 1133-1138

KONESKI, J. A. u. E. B. CASELLA (2010):

Attention deficit and hyperactivity disorder in people with epilepsy: diagnosis and implications to the treatment.

Arquivos de neuro-psiquiatria 68, 107-114

KOTLOSKI, R., M. LYNCH, S. LAUERSDORF u. T. SUTULA (2002):

Repeated brief seizures induce progressive hippocampal neuron loss and memory deficits.

Progress in brain research 135, 95-110

KRENTZ, A. J. u. C. J. BAILEY (2005):

Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus.

Drugs 65, 385-411

KREUTZBERG, G. W. (1996):

Microglia: a sensor for pathological events in the CNS.

Trends in neurosciences 19, 312-318

KUHN, H. G., H. DICKINSON-ANSON u. F. H. GAGE (1996):

Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation.

The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience
16, 2027-2033

KWAN, P. u. M. J. BRODIE (2006):

Refractory epilepsy: mechanisms and solutions.

Expert review of neurotherapeutics 6, 397-406

LAENG, P., R. L. PITTS, A. L. LEMIRE, C. E. DRABIK, A. WEINER, H.
TANG, R. THYAGARAJAN, B. S. MALLON u. C. A. ALTAR (2004):

The mood stabilizer valproic acid stimulates GABA neurogenesis from rat forebrain stem cells.

Journal of neurochemistry 91, 238-251

LANDGRAF, R. u. A. WIGGER (2002):

High vs low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety.

Behavior genetics 32, 301-314

LANDRETH, G., Q. JIANG, S. MANDREKAR u. M. HENKA (2008):

PPARgamma agonists as therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease.

Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics 5, 481-489

LEE, C. H., O. K. PARK, K. Y. YOO, K. BYUN, B. LEE, J. H. CHOI, I. K. HWANG, Y. M. KIM u. M. H. WON (2011):

The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, and effects of its agonist, rosiglitazone, on transient cerebral ischemic damage.

Journal of the neurological sciences 300, 120-129

LEE, S. J. u. S. LEE (2002):

Toll-like receptors and inflammation in the CNS.

Current drug targets. Inflammation and allergy 1, 181-191

LEHMANN, J. M., L. B. MOORE, T. A. SMITH-OLIVER, W. O. WILKISON, T. M. WILLSON u. S. A. KLIEWER (1995):

An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma).

The Journal of biological chemistry 270, 12953-12956

LEHRNER, J., R. KALCHMAYR, W. SERLES, A. OLBRICH, E. PATARAIA, S. AULL, J. BACHER, F. LEUTMEZER, G. GROPPPEL, L. DEECKE u. C. BAUMGARTNER (1999):

Health-related quality of life (HRQOL), activity of daily living (ADL) and depressive mood disorder in temporal lobe epilepsy patients.

Seizure : the journal of the British Epilepsy Association 8, 88-92

LESPINET, V., C. BRESSON, B. N'KAOUA, A. ROUGIER u. B. CLAVERIE (2002):

Effect of age of onset of temporal lobe epilepsy on the severity and the nature of preoperative memory deficits.

Neuropsychologia 40, 1591-1600

LI, M., G. PASCUAL u. C. K. GLASS (2000):

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene.

Molecular and cellular biology 20, 4699-4707

LI, X., J. DU, S. XU, X. LIN u. Z. LING (2013):

Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone reduces secondary damage in experimental spinal cord injury.

The Journal of international medical research 41, 153-161

LICKO, T., N. SEEGER, C. ZELLINGER, V. RUSSMANN, A. MATAGNE u.
H. POTSCHKA (2013):

Lacosamide treatment following status epilepticus attenuates neuronal cell loss and alterations in hippocampal neurogenesis in a rat electrical status epilepticus model.

Epilepsia 54, 1176-1185

LIU, B., K. WANG, H. M. GAO, B. MANDAVILLI, J. Y. WANG u. J. S. HONG
(2001):

Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis.

Journal of neurochemistry 77, 182-189

LORING, D. W. u. K. J. MEADOR (2001):

Cognitive and behavioral effects of epilepsy treatment.

Epilepsia 42 Suppl 8, 24-32

LÖSCHER, W. (2002):

Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy.

Epilepsy research 50, 105-123

LÖSCHER, W. (2003):

Pharmakologische Grundlagen zur Behandlung der Epilepsie bei Hund und Katze.

Der Praktische Tierarzt 8, 574-587

LÖSCHER, W. (2011):

Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs.

Seizure : the journal of the British Epilepsy Association 20, 359-368

LÖSCHER, W. u. C. BRANDT (2010):

Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research.

Pharmacological reviews 62, 668-700

LÖSCHER, W. u. H. POTSCHKA (2002):

Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs.

The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 301, 7-14

LÖSCHER, W., H. POTSCHKA, S. RIECK, A. TIPOLD u. C. RUNDFELDT (2004):

Anticonvulsant efficacy of the low-affinity partial benzodiazepine receptor agonist ELB 138 in a dog seizure model and in epileptic dogs with spontaneously recurrent seizures.

Epilepsia 45, 1228-1239

LOWENSTEIN, D. H., T. BLECK u. R. L. MACDONALD (1999):

It's time to revise the definition of status epilepticus.

Epilepsia 40, 120-122

LUNA-MEDINA, R., M. CORTES-CANTELI, M. ALONSO, A. SANTOS, A. MARTINEZ u. A. PEREZ-CASTILLO (2005):

Regulation of inflammatory response in neural cells in vitro by thiadiazolidinones derivatives through peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation.

The Journal of biological chemistry 280, 21453-21462

LUO, Y., W. YIN, A. P. SIGNORE, F. ZHANG, Z. HONG, S. WANG, S. H. GRAHAM u. J. CHEN (2006):

Neuroprotection against focal ischemic brain injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone.

Journal of neurochemistry 97, 435-448

LYNCH, M. A. (2009):

The multifaceted profile of activated microglia.

Molecular neurobiology 40, 139-156

MANEV, H., M. FAVARON, A. GUIDOTTI u. E. COSTA (1989):

Delayed increase of Ca²⁺ influx elicited by glutamate: role in neuronal death.

Molecular pharmacology 36, 106-112

MANGELSDORF, D. J., C. THUMMEL, M. BEATO, P. HERRLICH, G. SCHUTZ, K. UMESONO, B. BLUMBERG, P. KASTNER, M. MARK, P. CHAMBON u. R. M. EVANS (1995):

The nuclear receptor superfamily: the second decade.

Cell 83, 835-839

MARKAKIS, E. A. u. F. H. GAGE (1999):

Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles.

The Journal of comparative neurology 406, 449-460

MARKS, D. H. (2013):

Drug utilization, safety and clinical use of Actos and Avandia.

The International journal of risk & safety in medicine 25, 39-51

MASUKAWA, L. M., L. J. BURDETTE, P. MCGONIGLE, H. WANG, W. O'CONNOR, M. R. SPERLING, M. J. O'CONNOR u. K. URUNO (1999):

Physiological and anatomical correlates of the human dentate gyrus: consequences or causes of epilepsy.

Advances in neurology 79, 781-794

MATTSON, R. H. (1991):

Emotional effects on seizure occurrence.

Advances in neurology 55, 453-460

MAZARATI, A., D. SHIN, S. AUVIN, R. CAPLAN u. R. SANKAR (2007):

Kindling epileptogenesis in immature rats leads to persistent depressive behavior.

Epilepsy & behavior : E&B 10, 377-383

MAZARATI, A., P. SIDDARTH, R. A. BALDWIN, D. SHIN, R. CAPLAN u. R. SANKAR (2008):

Depression after status epilepticus: behavioural and biochemical deficits and effects of fluoxetine.

Brain : a journal of neurology 131, 2071-2083

MAZARATI, A. M., D. SHIN, Y. S. KWON, A. BRAGIN, E. PINEDA, D. TIO, A. N. TAYLOR u. R. SANKAR (2009):

Elevated plasma corticosterone level and depressive behavior in experimental temporal lobe epilepsy.

Neurobiology of disease 34, 457-461

MCNAMARA, J. O. (1994):

Cellular and molecular basis of epilepsy.

The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 14, 3413-3425

MEDZHITOV, R. (2001):

Toll-like receptors and innate immunity.

Nature reviews. Immunology 1, 135-145

MICHELUCCI, A., T. HEURTAUX, L. GRANDBARBE, E. MORGA u. P. HEUSCHLING (2009):

Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta.

Journal of neuroimmunology 210, 3-12

MILDNER, A., H. SCHMIDT, M. NITSCHKE, D. MERKLER, U. K. HANISCH, M. MACK, M. HEIKENWALDER, W. BRUCK, J. PRILLER u. M. PRINZ (2007):

Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions.

Nature neuroscience 10, 1544-1553

MILLER, B. W., K. C. WILLETT u. A. R. DESILETS (2011):

Rosiglitazone and pioglitazone for the treatment of Alzheimer's disease.

The Annals of pharmacotherapy 45, 1416-1424

MING, G. L. u. H. SONG (2005):

Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system.

Annual review of neuroscience 28, 223-250

MIWA, T., S. FURUKAWA, K. NAKAJIMA, Y. FURUKAWA u. S. KOHSAKA (1997):

Lipopolysaccharide enhances synthesis of brain-derived neurotrophic factor in cultured rat microglia.

Journal of neuroscience research 50, 1023-1029

MOHANRAJ, R. u. M. J. BRODIE (2006):

Diagnosing refractory epilepsy: response to sequential treatment schedules.

European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies 13, 277-282

MONTGOMERY, K. C. (1955):

The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior.

Journal of comparative and physiological psychology 48, 254-260

MOORE, P. M. u. G. A. BAKER (2002):

The neuropsychological and emotional consequences of living with intractable temporal lobe epilepsy: implications for clinical management.

Seizure : the journal of the British Epilepsy Association 11, 224-230

MORAES, L. A., L. PIQUERAS u. D. BISHOP-BAILEY (2006):

Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation.

Pharmacology & therapeutics 110, 371-385

MORRIS, G. P., I. A. CLARK, R. ZINN u. B. VISSEL (2013):

Microglia: a new frontier for synaptic plasticity, learning and memory, and neurodegenerative disease research.

Neurobiology of learning and memory 105, 40-53

MORRIS, R. (1984):

Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat.

Journal of neuroscience methods 11, 47-60

MORRIS, R. G., P. GARRUD, J. N. RAWLINS u. J. O'KEEFE (1982):

Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions.

Nature 297, 681-683

MOSSER, D. M. (2003):

The many faces of macrophage activation.

Journal of leukocyte biology 73, 209-212

MULA, M. (2013):

Treatment of anxiety disorders in epilepsy: an evidence-based approach.

Epilepsia 54 Suppl 1, 13-18

NADLER, J. V. (2003):

The recurrent mossy fiber pathway of the epileptic brain.

Neurochemical research 28, 1649-1658

NGUGI, A. K., C. BOTTOMLEY, I. KLEINSCHMIDT, J. W. SANDER u. C. R. NEWTON (2010):

Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach.

Epilepsia 51, 883-890

O'DONOGHUE, M. F., D. M. GOODRIDGE, K. REDHEAD, J. W. SANDER u. J. S. DUNCAN (1999):

Assessing the psychosocial consequences of epilepsy: a community-based study.

The British journal of general practice : the journal of the Royal College of General Practitioners 49, 211-214

OKAZAKI, M. M., D. A. EVENSON u. J. V. NADLER (1995):

Hippocampal mossy fiber sprouting and synapse formation after status epilepticus in rats: visualization after retrograde transport of biocytin.

The Journal of comparative neurology 352, 515-534

OYEGBILE, T. O., C. DOW, J. JONES, B. BELL, P. RUTECKI, R. SHETH, M. SEIDENBERG u. B. P. HERMANN (2004):

The nature and course of neuropsychological morbidity in chronic temporal lobe epilepsy.

Neurology 62, 1736-1742

PARENT, J. M. u. D. H. LOWENSTEIN (1997):

Mossy fiber reorganization in the epileptic hippocampus.

Current opinion in neurology 10, 103-109

PARENT, J. M. u. D. H. LOWENSTEIN (2002):

Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain?

Progress in brain research 135, 121-131

PARENT, J. M., T. W. YU, R. T. LEIBOWITZ, D. H. GESCHWIND, R. S. SLOVITER u. D. H. LOWENSTEIN (1997):

Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus.

The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 17, 3727-3738

PARKS, D. J., N. C. TOMKINSON, M. S. VILLENEUVE, S. G. BLANCHARD u. T. M. WILLSON (1998):

Differential activity of rosiglitazone enantiomers at PPAR gamma.

Bioorganic & medicinal chemistry letters 8, 3657-3658

PAXINOS, G. u. C. WATSON (2005):

The rat brain in stereotaxic coordinates.

Academic Press Burlington, San Diego, London,

PEKCEC, A., B. UNKRUEER, J. SCHLICHTIGER, J. SOERENSEN, A. M.

HARTZ, B. BAUER, E. A. VAN VLIET, J. A. GORTER u. H. POTSCHKA (2009):

Targeting prostaglandin E2 EP1 receptors prevents seizure-associated P-glycoprotein up-regulation.

The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 330, 939-947

PELLOW, S., P. CHOPIN, S. E. FILE u. M. BRILEY (1985):

Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat.

Journal of neuroscience methods 14, 149-167

PEREIRA, M. P., O. HURTADO, A. CARDENAS, L. BOSCA, J. CASTILLO, A. DAVALOS, J. VIVANCOS, J. SERENA, P. LORENZO, I. LIZASOAIN u. M. A. MORO (2006):

Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 cause potent neuroprotection after experimental stroke through noncompletely overlapping mechanisms.

Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism 26, 218-229

PITKANEN, A., I. KHARATISHVILI, H. KARHUNEN, K. LUKASIUK, R. IMMONEN, J. NAIRISMAGI, O. GROHN u. J. NISSINEN (2007):

Epileptogenesis in experimental models.

Epilepsia 48 Suppl 2, 13-20

PITKANEN, A., J. TUUNANEN, R. KALVIAINEN, K. PARTANEN u. T. SALMENPERA (1998):

Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy.

Epilepsy research 32, 233-253

PLATA-SALAMAN, C. R., S. E. ILYIN, N. P. TURRIN, D. GAYLE, M. C. FLYNN, A. E. ROMANOVITCH, M. E. KELLY, Y. BUREAU, H. ANISMAN u. D. C. MCINTYRE (2000):

Kindling modulates the IL-1beta system, TNF-alpha, TGF-beta1, and neuropeptide mRNAs in specific brain regions.

Brain research. Molecular brain research 75, 248-258

PODELL, M. (1998):

Antiepileptic drug therapy.

Clinical techniques in small animal practice 13, 185-192

PODELL, M., W. R. FENNER u. J. D. POWERS (1995):

Seizure classification in dogs from a nonreferral-based population.

Journal of the American Veterinary Medical Association 206, 1721-1728

POLAZZI, E. u. A. CONTESTABILE (2006):

Overactivation of LPS-stimulated microglial cells by co-cultured neurons or neuron-conditioned medium.

Journal of neuroimmunology 172, 104-111

POTSCHKA, H. (2010):

Transporter hypothesis of drug-resistant epilepsy: challenges for pharmacogenetic approaches.

Pharmacogenomics 11, 1427-1438

POTSCHKA, H., H. A. VOLK u. A. PEKCEC (2009):

Aktueller Stand und Trends in der Epilepsitherapie bei Hund und Katze.

Tierärztliche Praxis Kleintiere 3, 211-217

PRUT, L. u. C. BELZUNG (2003):

The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review.

European journal of pharmacology 463, 3-33

PULLIAINEN, V., P. KUIKKA u. M. JOKELAINEN (2000):

Motor and cognitive functions in newly diagnosed adult seizure patients before antiepileptic medication.

Acta neurologica Scandinavica 101, 73-78

RAVIZZA, T., S. BALOSSO u. A. VEZZANI (2011):

Inflammation and prevention of epileptogenesis.

Neuroscience letters 497, 223-230

RAVIZZA, T., M. RIZZI, C. PEREGO, C. RICHICHI, J. VELISKOVA, S. L. MOSHE, M. G. DE SIMONI u. A. VEZZANI (2005):

Inflammatory response and glia activation in developing rat hippocampus after status epilepticus.

Epilepsia 46 Suppl 5, 113-117

REMY, S., S. GABRIEL, B. W. URBAN, D. DIETRICH, T. N. LEHMANN, C. E. ELGER, U. HEINEMANN u. H. BECK (2003):

A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy.

Annals of neurology 53, 469-479

RICOTE, M., A. C. LI, T. M. WILLSON, C. J. KELLY u. C. K. GLASS (1998):

The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation.

Nature 391, 79-82

RIZZI, M., C. PEREGO, M. ALIPRANDI, C. RICHICHI, T. RAVIZZA, D. COLELLA, J. VELISKOVA, S. L. MOSHE, M. G. DE SIMONI u. A. VEZZANI (2003):

Glia activation and cytokine increase in rat hippocampus by kainic acid-induced status epilepticus during postnatal development.

Neurobiology of disease 14, 494-503

ROMERO, L. I., J. B. TATRO, J. A. FIELD u. S. REICHLIN (1996):

Roles of IL-1 and TNF-alpha in endotoxin-induced activation of nitric oxide synthase in cultured rat brain cells.

The American journal of physiology 270, R326-332

ROSEN, E. D., R. N. KULKARNI, P. SARRAF, U. OZCAN, T. OKADA, C. H. HSU, D. EISENMAN, M. A. MAGNUSON, F. J. GONZALEZ, C. R. KAHN u. B. M. SPIEGELMAN (2003):

Targeted elimination of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in beta cells leads to abnormalities in islet mass without compromising glucose homeostasis.

Molecular and cellular biology 23, 7222-7229

ROSEN, E. D., P. SARRAF, A. E. TROY, G. BRADWIN, K. MOORE, D. S. MILSTONE, B. M. SPIEGELMAN u. R. M. MORTENSEN (1999):

PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro.

Molecular cell 4, 611-617

RUSSMANN, V., N. SEEGER, C. ZELLINGER, M. HADAMITZKY, S. PANKRATOVA, H. WENDT, E. BOCK, V. BEREZIN u. H. POTSCHKA (2013):

The CNTF-derived peptide mimetic Cintrofin attenuates spatial-learning deficits in a rat post-status epilepticus model.

Neuroscience letters

SAIN, H., B. SHARMA, A. S. JAGGI u. N. SINGH (2011):

Pharmacological investigations on potential of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists in hyperhomocysteinemia-induced vascular dementia in rats.

Neuroscience 192, 322-333

SARAFIDIS, P. A. (2008):

Thiazolidinedione derivatives in diabetes and cardiovascular disease: an update.

Fundamental & clinical pharmacology 22, 247-264

SARAFIDIS, P. A. u. G. L. BAKRIS (2006):

Protection of the kidney by thiazolidinediones: an assessment from bench to bedside.

Kidney international 70, 1223-1233

SARAFIDIS, P. A. u. A. N. LASARIDIS (2006):

Actions of peroxisome proliferator-activated receptors-gamma agonists explaining a possible blood pressure-lowering effect.

American journal of hypertension 19, 646-653

SARRUF, D. A., F. YU, H. T. NGUYEN, D. L. WILLIAMS, R. L. PRINTZ, K. D. NISWENDER u. M. W. SCHWARTZ (2009):

Expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in key neuronal subsets regulating glucose metabolism and energy homeostasis.

Endocrinology 150, 707-712

SATO, M., R. J. RACINE u. D. C. MCINTYRE (1990):

Kindling: basic mechanisms and clinical validity.

Electroencephalography and clinical neurophysiology 76, 459-472

SAYAN-OZACMAK, H., V. H. OZACMAK, F. BARUT u. E. JAKUBOWSKA-DOGRU (2011):

Neuroprotective efficacy of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand in chronic cerebral hypoperfusion.

Current neurovascular research 8, 190-199

SAYIN, U., S. OSTING, J. HAGEN, P. RUTECKI u. T. SUTULA (2003):

Spontaneous seizures and loss of axo-axonic and axo-somatic inhibition induced by repeated brief seizures in kindled rats.

The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 23, 2759-2768

SCHARFMAN, H. E., J. H. GOODMAN u. A. L. SOLLAS (2000):

Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis.

The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 20, 6144-6158

SCHMIDT, D. u. W. LOSCHER (2005):

Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms.

Epilepsia 46, 858-877

SCHWABE, J. W., L. CHAPMAN, J. T. FINCH u. D. RHODES (1993):

The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements.

Cell 75, 567-578

SCHWARTZ-PORSCHKE, D. u. U. JURGENS (1991):

[Effectiveness of bromide in therapy resistant epilepsy of dogs].

Tierärztliche Praxis 19, 395-401

SEEGER, N., C. ZELLINGER, A. RODE, F. ROLOFF, G. BICKER, V. RUSSMANN, S. FISCHBORN, H. WENDT u. H. POTSCHKA (2011):

The erythropoietin-derived peptide mimetic pHBP affects cellular and cognitive consequences in a rat post-status epilepticus model.

Epilepsia 52, 2333-2343

SHANKARAN, M., C. KING, J. LEE, R. BUSCH, M. WOLFF u. M. K. HELLERSTEIN (2006):

Discovery of novel hippocampal neurogenic agents by using an in vivo stable isotope labeling technique.

The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 319, 1172-1181

SHEU, W. H., H. C. CHUANG, S. M. CHENG, M. R. LEE, C. C. CHOU u. F. C.

CHENG (2011):

Microdialysis combined blood sampling technique for the determination of rosiglitazone and glucose in brain and blood of gerbils subjected to cerebral ischemia.

Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 54, 759-764

SHIHAB, N., J. BOWEN u. H. A. VOLK (2011):

Behavioral changes in dogs associated with the development of idiopathic epilepsy.

Epilepsy & behavior : E&B 21, 160-167

SHORS, T. J., G. MIESEGAES, A. BEYLIN, M. ZHAO, T. RYDEL u. E. GOULD (2001):

Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories.

Nature 410, 372-376

SIEBZEHRUBL, F. A. u. I. BLUMCKE (2008):

Neurogenesis in the human hippocampus and its relevance to temporal lobe epilepsies.

Epilepsia 49 Suppl 5, 55-65

SINOWATZ, F. u. H. HEES (2006):

Histologie - Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie.

SMITH, D. F., G. A. BAKER, M. DEWEY, A. JACOBY u. D. W. CHADWICK (1991):

Seizure frequency, patient-perceived seizure severity and the psychosocial consequences of intractable epilepsy.

Epilepsy research 9, 231-241

SNYDER, R. W. u. J. S. BERNIS (2004):

Use of insulin and oral hypoglycemic medications in patients with diabetes mellitus and advanced kidney disease.

Semin Dialysis 17, 365-370

SODERLUND, H., M. MOSCOVITCH, N. KUMAR, M. MANDIC u. B. LEVINE (2012):

As time goes by: hippocampal connectivity changes with remoteness of autobiographical memory retrieval.

Hippocampus 22, 670-679

SPIEGELMAN, B. M. (1998):

PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor.

Diabetes 47, 507-514

STABLES, J. P., E. BERTRAM, F. E. DUDEK, G. HOLMES, G. MATHERN, A. PITKANEN u. H. S. WHITE (2003):

Therapy discovery for pharmaco-resistant epilepsy and for disease-modifying therapeutics: summary of the NIH/NINDS/AES models II workshop.

Epilepsia 44, 1472-1478

STAFSTROM, C. (2006):

Behavioural and cognitive testing procedures in animal models of epilepsy.

In: Models of Seizures and Epilepsy

Elsevier Academic Press, S. 613-628

STEWART, L. S., L. S. LEUNG u. M. A. PERSINGER (2001):

Diurnal variation in pilocarpine-induced generalized tonic-clonic seizure activity.

Epilepsy research 44, 207-212

STREIT, W. J., J. R. CONDE, S. E. FENDRICK, B. E. FLANARY u. C. L. MARIANI (2005):

Role of microglia in the central nervous system's immune response.

Neurological research 27, 685-691

SUN, H., Y. HUANG, X. YU, Y. LI, J. YANG, R. LI, Y. DENG u. G. ZHAO (2008):

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, rosiglitazone, suppresses CD40 expression and attenuates inflammatory responses after lithium pilocarpine-induced status epilepticus in rats.

International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience 26, 505-515

SUTHERLAND, R. J., I. Q. WHISHAW u. B. KOLB (1983):

A behavioural analysis of spatial localization following electrolytic, kainate- or colchicine-induced damage to the hippocampal formation in the rat.

Behavioural brain research 7, 133-153

SUTHERLAND, R. J., I. Q. WHISHAW u. J. C. REGEHR (1982):

Cholinergic receptor blockade impairs spatial localization by use of distal cues in the rat.

Journal of comparative and physiological psychology 96, 563-573

SUTULA, T. (2002):

Seizure-Induced Axonal Sprouting: Assessing Connections Between Injury, Local Circuits, and Epileptogenesis.

Epilepsy currents / American Epilepsy Society 2, 86-91

TANIWAKI, Y., M. KATO, T. ARAKI u. T. KOBAYASHI (1996):

Microglial activation by epileptic activities through the propagation pathway of kainic acid-induced hippocampal seizures in the rat.

Neuroscience letters 217, 29-32

TEISMANN, P., K. TIEU, O. COHEN, D. K. CHOI, D. C. WU, D. MARKS, M. VILA, V. JACKSON-LEWIS u. S. PRZEDBORSKI (2003):

Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease.

Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 18, 121-129

TELLEZ-ZENTENO, J. F., S. B. PATTEN, N. JETTE, J. WILLIAMS u. S. WIEBE (2007):

Psychiatric comorbidity in epilepsy: a population-based analysis.

Epilepsia 48, 2336-2344

TEMKIN, N. R. (2009):

Preventing and treating posttraumatic seizures: the human experience.

Epilepsia 50 Suppl 2, 10-13

TITLIC, M., S. BASIC, S. HAJNSEK u. I. LUSIC (2009):

Comorbidity psychiatric disorders in epilepsy: a review of literature.

Bratislavske lekarske listy 110, 105-109

TONTONOZ, P., R. A. GRAVES, A. I. BUDAVARI, H. ERDJUMENT-BROMAGE, M. LUI, E. HU, P. TEMPST u. B. M. SPIEGELMAN (1994):

Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha.

Nucleic acids research 22, 5628-5634

TUREYEN, K., R. KAPADIA, K. K. BOWEN, I. SATRIOTOMO, J. LIANG, D. L. FEINSTEIN u. R. VEMUGANTI (2007):

Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists induce neuroprotection following transient focal ischemia in normotensive, normoglycemic as well as hypertensive and type-2 diabetic rodents.

Journal of neurochemistry 101, 41-56

TUUNANEN, J., T. HALONEN u. A. PITKANEN (1997):

Decrease in somatostatin-immunoreactive neurons in the rat amygdaloid complex in a kindling model of temporal lobe epilepsy.

Epilepsy research 26, 315-327

VAN PRAAG, H., A. F. SCHINDER, B. R. CHRISTIE, N. TONI, T. D. PALMER u. F. H. GAGE (2002):

Functional neurogenesis in the adult hippocampus.

Nature 415, 1030-1034

VAN RIJCKEVORSEL, K. (2006):

Cognitive problems related to epilepsy syndromes, especially malignant epilepsies.

Seizure : the journal of the British Epilepsy Association 15, 227-234

VEZZANI, A., E. ARONICA, A. MAZARATI u. Q. J. PITTMAN (2013):

Epilepsy and brain inflammation.

Experimental neurology 244, 11-21

VEZZANI, A., S. BALOSSO u. T. RAVIZZA (2008):

The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy.

Brain, behavior, and immunity 22, 797-803

VORHEES, C. V. u. M. T. WILLIAMS (2006):

Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory.

Nature protocols 1, 848-858

WAKINO, S., U. KINTSCHER, S. KIM, F. YIN, W. A. HSUEH u. R. E. LAW (2000):

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit retinoblastoma phosphorylation and G1--> S transition in vascular smooth muscle cells.

The Journal of biological chemistry 275, 22435-22441

WALKER, M. C., H. S. WHITE u. J. W. SANDER (2002):

Disease modification in partial epilepsy.

Brain : a journal of neurology 125, 1937-1950

WALSH, R. N. u. R. A. CUMMINS (1976):

The Open-Field Test: a critical review.

Psychological bulletin 83, 482-504

WALTER, L. u. H. NEUMANN (2009):

Role of microglia in neuronal degeneration and regeneration.

Seminars in immunopathology 31, 513-525

WANG, B. W., V. HOK, A. DELLA-CHIESA, C. CALLAGHAN, S. BARLOW, M. TSANOV, R. BECHARA, E. IRVING, D. J. VIRLEY, N. UPTON u. S. M. O'MARA (2012):

Rosiglitazone enhances learning, place cell activity, and synaptic plasticity in middle-aged rats.

Neurobiology of aging 33, 835 e813-830

WATSON, G. S., B. A. CHOLERTON, M. A. REGER, L. D. BAKER, S. R. PLYMATE, S. ASTHANA, M. A. FISHEL, J. J. KULSTAD, P. S. GREEN, D. G. COOK, S. E. KAHN, M. L. KEELING u. S. CRAFT (2005):

Preserved cognition in patients with early Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment during treatment with rosiglitazone: a preliminary study.

The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry 13, 950-958

WEINSTEIN, J. R., I. P. KOERNER u. T. MOLLER (2010):

Microglia in ischemic brain injury.

Future neurology 5, 227-246

WEST, M. J., L. SLOMIANKA u. H. J. GUNDERSEN (1991):

Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in

thesubdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator.

The Anatomical record 231, 482-497

WILLSON, T. M., P. J. BROWN, D. D. STERNBACH u. B. R. HENKE (2000):

The PPARs: from orphan receptors to drug discovery.

Journal of medicinal chemistry 43, 527-550

WILLSON, T. M., M. H. LAMBERT u. S. A. KLIEWER (2001):

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease.

Annual review of biochemistry 70, 341-367

WILLSON, T. M. u. W. WAHLI (1997):

Peroxisome proliferator-activated receptor agonists.

Current opinion in chemical biology 1, 235-241

XU, J. u. P. D. DREW (2007):

Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists suppress the production of IL-12 family cytokines by activated glia.

J Immunol 178, 1904-1913

YANG, X. Y., L. H. WANG, T. CHEN, D. R. HODGE, J. H. RESAU, L. DASILVA u. W. L. FARRAR (2000):

Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-

activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT.

The Journal of biological chemistry 275, 4541-4544

YILMAZER-HANKE, D. M., H. K. WOLF, J. SCHRAMM, C. E. ELGER, O. D. WIESTLER u. I. BLUMCKE (2000):

Subregional pathology of the amygdala complex and entorhinal region in surgical specimens from patients with pharmacoresistant temporal lobe epilepsy.

Journal of neuropathology and experimental neurology 59, 907-920

YOO, D. Y., W. KIM, D. W. KIM, S. M. NAM, H. Y. JUNG, J. W. KIM, C. H. LEE, J. H. CHOI, M. H. WON, Y. S. YOON u. I. K. HWANG (2013):

Cell proliferation and neuroblast differentiation in the dentate gyrus of high-fat diet-fed mice are increased after rosiglitazone treatment.

Journal of veterinary science

YU, X., X. G. SHAO, H. SUN, Y. N. LI, J. YANG, Y. C. DENG u. Y. G. HUANG (2008):

Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma exerts neuroprotection by inhibiting oxidative stress following pilocarpine-induced status epilepticus.

Brain research 1200, 146-158

ZELLINGER, C., J. D. SALVAMOSER, N. SEEGER, V. RUSSMANN u. H. POTSCHKA (2014):

Impact of the Neural Cell Adhesion Molecule-Derived Peptide FGL on Seizure Progression and Cellular Alterations in the Mouse Kindling Model.

ACS chemical neuroscience

ZHAN, R. Z., O. TIMOFEEVA u. J. V. NADLER (2010):

High ratio of synaptic excitation to synaptic inhibition in hilar ectopic granule cells of pilocarpine-treated rats.

Journal of neurophysiology 104, 3293-3304

ZHANG, H., A. ZHANG, D. E. KOHAN, R. D. NELSON, F. J. GONZALEZ u. T. YANG (2005):

Collecting duct-specific deletion of peroxisome proliferator-activated receptor gamma blocks thiazolidinedione-induced fluid retention.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 9406-9411

ZHU, Y., C. QI, S. JAIN, M. S. RAO u. J. K. REDDY (1997):

Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor.

The Journal of biological chemistry 272, 25500-25506

ZIMMER, L. A., M. ENNIS u. M. T. SHIPLEY (1997):

Soman-induced seizures rapidly activate astrocytes and microglia in discrete brain regions.

The Journal of comparative neurology 378, 482-492

X. ANHANG

1. Abbruchkriterien nach dem Irwin-Score-System

Kriterien	Score-Wert	Definition
Körperhaltung	0	Flach, auf der Seite oder auf dem Bauch liegend, kein Muskeltonus
	1	Teilweise erhaltener Muskeltonus, gelegentlich Haltungskorrekturen
	2	Normale Körperhaltung
	3	Starre oder verkrampfte Haltung (z.B. Ophistotonus)
	4	Tiere zeigen keine Ruhelage, daher nicht bewertbar
Hautdurchblutung	0	Schwanz und Pfoten bläulich verfärbt: Zyanose
	1	Fast weiße Ohrmuscheln, Pfoten oder Schwänze
	2	Normale Hautdurchblutung
	3	Pfoten dunkelrosa, Schwanz kräftig hellrosa
	4	Pfoten, Ohrmuscheln oder Schwanz rot
Atmung	0	Schnappatmung, akute Atemnot
	1	Verminderte, unregelmäßige, angestrenzte Atmung
	2	Normale Atmung
	3	Erhöhte Atemfrequenz

	4	Wie 3, jedoch auch in Ruhephasen
Vokalisation	3	Zeitweise spontan auftretendes leises Piepsen
	4	Häufiger spontan auftretendes leises Piepsen
Ptosis	0	Augenlider geschlossen
	1	Augenlider zur Hälfte geöffnet
	2	Augenlider normal geöffnet
Exophthalmus	3	Leichter Exophthalmus
	4	Ausgeprägter Exophthalmus
Piloerektion	4	Vorhanden
Schwanztonus	0	Nachschleifen des Schwanzes beim Laufen
	2	Normale Schwanzhaltung
	3	Aufgestellter Schwanz (max. 90°-Winkel) während Ruhe- und Aktivitätsperiode, teilweise Schwanzschlagen
	4	Über den Körper aufgestellter Schwanz (Straub-Phänomen)
Lakrimation	4	Vorhanden
Stereotypien	4	Vorhanden
Lokomotorische Aktivität	0	Ausfall
	1	Verminderte Bewegung, gelegentliches putzen
	2	Normaler Bewegungsablauf

	3	Vermehrte, kräftige, eckige Bewegungen
	4	Ruheloser Bewegungstyp
Neugierverhalten (auf Vorzeigen eines Gegenstandes)	0	Keine Reaktion
Neugierverhalten (auf Vorzeigen eines Gegenstandes) Berührungsreaktion	1	Vermindertes Neugierverhalten
Neugierverhalten (auf Vorzeigen eines Gegenstandes) Berührungsreaktion Berührungsreaktion Ataxie	2	Normal, Interesse am dargebotenen Gegenstand
	3	Ruckartiges Verfolgen, auch bei mehrmaligem Zurückziehen keine Adaption
	4	Angriffsverhalten
	0	Ausfall, auch stärkere Reize bleiben ohne Reaktion
	1	Nach mehrfachem oder verstärktem Reiz langsame, abgeschwächte Reaktion (Ducken, Entweichen)
Berührungsreaktion Ataxie Ataxie Körpertemperatur	2	Normale Reaktion auf leichte Berührung
	3	Ausweichen oder Ducken auf leichte Berührung
	4	Flüchten über größere Distanz, Angriffsverhalten, Vokalisation auf leichte Berührung

	3	Koordinierungsstörungen beim Laufen
	4	Ausfall der Bewegungskoordination
Ataxie	1	Temperatur um 2°C oder mehr gegenüber der Kontrolle vermindert
Körpertemperatur	2	Temperatur normal
Körpertemperatur		
Reaktion auf Halten im Genick		
Körpertemperatur	3	Temperatur um 2°C oder mehr gegenüber der Kontrolle erhöht
Reaktion auf Halten im Genick	0	Völlig schlapp
Reaktion auf Halten im Genick	1	Geringer Tonus
Bauchdeckenspannung		
Reaktion auf Halten im Genick	2	Normaler Muskeltonus
Bauchdeckenspannung	3	Erhöhter Tonus
Bauchdeckenspannung	4	Völlige Körperstarre
Faeces	1	Verringerter Muskeltonus
	2	Normal
Bauchdeckenspannung	3	Erhöhte Muskelspannung
Faeces	0	Kein oder kaum Kot im Käfig
Faeces	2	Kotbeschaffenheit und Menge normal
Schreckhaftigkeit (auf Schnippen mit den Fingern)		
Faeces	3	Kotmenge deutlich vermehrt
Schreckhaftigkeit (auf Schnippen mit den Fingern)	4	Fast flüssiger Kot, Diarrhoe

Schnippen mit den Fingern) Schreckhaftigkeit (auf Schnippen mit den Fingern) Rektaltemperatur	0	Ausfall
	1	Abgeschwächte, verzögerte Schreckreaktion
Schreckhaftigkeit (auf Schnippen mit den Fingern) Rektaltemperatur Rektaltemperatur	2	Normale Schreckreaktion
	3	Flucht
	4	Starkes Zusammenzucken, Zukneifen der Augen, Anlegen der Ohren
	1	Temperatur um 2°C oder mehr gegenüber der Kontrolle vermindert
	2	Temperatur normal
Rektaltemperatur	3	Temperatur um 2°C oder mehr gegenüber der Kontrolle erhöht

Der *Score*-Wert 2 steht für ein unverändertes Einstufungskriterium. Schreckhaftigkeit und Rektaltemperatur wurden nur bei Abweichung der anderen oben aufgeführten Kriterien untersucht.

2. Lösungen

Blocking-Lösung

- in 9 ml *Carrier*-Lösung
- 1 ml Serum (Ziege, Kaninchen oder Esel)
- 200 mg bovines Serumalbumin

Carrier-Lösung

- in 100 ml TBS
- 1,5 ml 20% iges Triton X100
- 1 g bovines Serumalbumin (BSA)
- 1 ml Serum (Ziege oder Esel)

Chrom-Gelatine-Lösung

- 7 g Gelatine
- 1 l Aqua dest. zugeben
- auf 60°C erhitzen bis die Gelatine gelöst ist
- 0,7 g Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat zugeben
- zwei Spatelspitzen Thymol zugeben
- ca. 3 Stunden bei 60°C auf den Magnetprüher rühren lassen
- auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen
- anschließend zweimal filtrieren

DAB-Kit

- 5 ml Aqua dest.
- 2 Tropfen der Puffer-Stammlösung zugeben und mischen
- 4 Tropfen der DAB-Stammlösung zugeben und mischen
- 2 Tropfen der Wasserstoffperoxid-Lösung hinzufügen und mischen
- 2 Tropfen der Nickel-Lösung zugeben und mischen

DAB-Lösungen (pro free-floating-Serie)

- 4 ml Tris-Nickel-Lösung
- 1,1 mg 3,3'-Diaminobenzidine-Tetrahydrochlorid in 100 µl Aqua dest. gelöst
- 1 µl H₂O₂ 35% frisch zugeben

Formamid/SSC

- 2 ml 100% Formamid
- 2 ml 4 x SSC zugeben

Gefriermedium

- 42,8 g Glucose-Monohydrat
- 0,7 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat
- in 250 ml 0,1 M Phosphatpuffer lösen
- ad 500 ml 87% iges Glyzerin

Natrium-Citrat-Puffer (pH 9)

- 2,94 g Natriumcitrat-dihydrat
- in 1000 ml Aqua dest. lösen
- mit 0,5 M NaOH pH-Wert auf 9 einstellen
- innerhalb einer Stunde immer wieder den pH-Wert kontrollieren und nachjustieren

8% iges Paraformaldehyd

- 800 ml Aqua dest. auf 60 – 70°C erhitzen
- 80 g Paraformaldehyd zugeben
- Tropfenweise 6 N NaOH zugeben bis die Lösung klar wird

- abkühlen lassen
- mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
- anschließend filtrieren

4% iges Paraformaldehyd

- 100 ml 8% iges Paraformaldehyd
- mit 100 ml 0,2 M Phosphatpuffer verdünnen

0,4 M Phosphatpuffer (pH 7,6) (Stammlösung)

- 45,43 g/l Na_2HPO_4 (wasserfrei)
- 12,48 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
- In Aqua dest. lösen und mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen

0,01 M phosphatgepufferte 0,9% ige Kochsalzlösung (pH 7,6)

- 100 ml 0,2 M Phosphatpuffer
- 18 g NaCl zugeben
- mit Aqua dest. auf 2 l auffüllen

20 x SSC (Stammlösung)

- 175,32 g NaCl (3 M)
- 88,23 g Natriumcitrat-dihydrat (0,3M) zugeben
- 1 l Aqua dest. hinzufügen

Thionin-Färbelösung für die Nissl-Färbung

- 100 ml 1 M Essigsäure und 36 ml 1 M NaOH

- mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
- auf 60 - 70°C erhitzen
- 1,25 g Thionin zugeben
- 1 Stunde auf dem Magnetrührer rühren lassen
- danach heiß filtrieren

0,05 M Tris-gepufferte Saline (TBS) (pH 7,6)

- 18 g NaCl
- 12,114 g Tris (0,05 M) zugeben
- mit Aqua dest. auf 2 l auffüllen
- pH-Wert mit 32% HCl auf 7,6 einstellen

Tris-Nickel-Lösung

- 500 ml TBS
- 3 g Ammoniumnickel(II)-sulfat Hexahydrat darin lösen
- Mit NaOH den pH-Wert auf 7,6 einstellen

3. Protokolle der Färbungen

Nissl-Färbung

- 3 min in 100% Ethanol
- 3 min in 95% Ethanol
- 3 min in 70% Ethanol
- 3 min in 50% Ethanol
- 3 min in Aqua dest.
- 20 sec in Thionin
- 3 min in 50% Ethanol

- 3 min in 70% Ethanol
- 3 min in 95% Ethanol
- 3 min in 100% Ethanol
- 3 min in Terpeneol/Rotisol-Mischung (1:1)
- 3 min in Rotisol
- 3 min in Rotisol
- Eindecken mit Entellan

Interleukin-1 beta

Tag 1:

- 3 x 5 min in je 10 ml TBS waschen
- 30 min bei 80°C in je 4 ml Natriumcitrat (pH 9) in kleinen Gläsern im Wasserbad demaskieren
- anschließend 5 min bei Raumtemperatur abkühlen lassen
- 3 x 5 min in je 10 ml TBS waschen
- 60 min in je 10 ml Blocking-Lösung (Ziege) inkubieren
- Über Nacht in je 3 ml anti-Interleukin-1 beta 1:200 in Carrier-Lösung (Ziege) bei 4°C inkubieren

Tag 2:

- 3 x 10 min in je 10 ml TBS waschen
- 60 min in je 3 ml sekundärem Antikörper (biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen) 1:500 in Carrier-Lösung (Ziege) inkubieren
- 3 x 5 min in je 10 ml TBS waschen
- 60 min in je 3 ml Streptavidin/HRP 1:1400 in TBS
- 3 x 5 min in je 10 ml TBS waschen
- 30 sec in DAB-Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) inkubieren

- 3 x 5 min in je 5 ml TBS waschen
- Gehirnschnitte mit Chrom-Gelatine auf Objektträger aufziehen
- Über Nacht die aufgezogenen Schnitte lufttrocknen lassen
- 1 min in Xylol
- Mit Entellan eindecken

BrdU/NeuN

Tag 1:

- 3 min in je 10 ml TBS waschen
- 2 h bei 65°C in Formamid/SSC-Mischung (2 ml 100% Formamid + 2 ml 4x SSC) denaturieren
- Anschließend 5 min bei Raumtemperatur abkühlen lassen
- 1 x 10 min in je 8 ml 2x SSC waschen
- 30 min bei 37°C in je 4 ml 2 M HCl denaturieren
- 2 x 5 min in je 8 ml 0,1 M Borsäure (pH 8,5) denaturieren
- 3 x 5 min in je 10 ml TBS waschen
- 60 min in je 3 ml Blocking-Lösung (Esel) inkubieren
- Über Nacht in anti-BrdU 1:30 und anti-NeuN 1:500 in je 1,5 ml Carrier-Lösung (Esel) bei 4°C inkubieren

Tag 2:

- 3 x 10 min in je 10 ml TBS waschen
- Ab jetzt im Dunkeln arbeiten
- 60 min in sekundärem Antikörper Cy3-Esel-anti-Ratte (1:1000) und biotinylierten Esel-anti.Maus (1:500) in je 2 ml Carrier-Lösung (Esel) inkubieren

- 3 x 10 min in je 10 ml TBS waschen
- 60 min in Streptavidin-Cy2 (1:2000) in je 3 ml TBS inkubieren
- 3 x 10 min in je 10 ml TBS waschen
- Gehirnschnitte mit Chrom-Gelatine auf Objektträger aufziehen
- Über Nacht die aufgezogenen Schnitte lufttrocknen lassen
- 1 min in Xylol
- Mit Entellan eindecken

ED 1

Tag 1:

- 3 x 5 min in je 10 ml TBS waschen
- 30 min bei 80°C in je 4 ml Natriumcitrat (pH 9) in kleinen Gläsern im Wasserbad demaskieren
- anschließend 5 min bei Raumtemperatur abkühlen lassen
- 3 x 5 min in je 10 ml TBS waschen
- 60 min in H₂O₂-Lösung (je 10 ml TBS + 150 µl H₂O₂ 30%) inkubieren
- 3 x 5 min in je 10 ml TBS waschen
- 60 min in je 10 ml Blocking-Lösung (Kaninchen) inkubieren
- Über Nacht in je 3 ml anti-ED 1 1:300 in Carrier-Lösung (Kaninchen) bei 4°C inkubieren

Tag 2:

- 3 x 10 min in je 10 ml TBS waschen
- 60 min in je 3 ml sekundärem Antikörper (biotinylierter Kaninchen-anti-Maus) 1:500 in Carrier-Lösung (Kaninchen) inkubieren
- 3 x 5 min in je 10 ml TBS waschen
- 30 sec in DAB-Lösung inkubieren

- 3 x 5 min in je 5 ml TBS waschen
- Gehirnschnitte mit Chrom-Gelatine auf Objektträger aufziehen
- Über Nacht die aufgezogenen Schnitte lufttrocknen lassen
- 1 min in Xylol
- Mit Entellan eindecken

4. Substanzen

Substanz	Hersteller
Anti-BrdU	AbD Serotec, Kidlington, UK
Anti-ED 1	AbD Serotec, Kidlington, UK
Anti-Interleukin-1 beta	Abcam, Cambridge, UK
Anti-NeuN	Merck Millipore, Billerica, USA
Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Biotinylierte Esel-anti.Maus	Jackson Immuno Research, Westgrove, USA
Biotinylierter Kaninchen-anti-Maus	Dako, Glostrup, Dänemark
Biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen	Dako, Glostrup, Dänemark
Bupivacain 0,5%	Jenapharm®, mibe GmbH, Brehna, Deutschland
Chloralhydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Cy3-Esel-anti-Ratte	Jackson Immuno Research, Westgrove, USA

3,3'-Diaminobenzidine-Tetrahydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DAB-Kit	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Diazepam (Diazepam-ratiopharm [®])	ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Einbettmedium für Gefrierschnitte (Jung Tissue Freezing Medium [®] ,)	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 99,9%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Gelatine	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Gentamicinsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glucose-Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glyzerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isofluran (Isofluran CP [®] ,)	cp-Pharma [®] , Burgdorf
Kaltpolymerisierender Kunststoff (Paladur [®])	Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Marbofloxacin (Marbocyl [®])	Vétoquinol GmbH, Ravensburg
Meloxicam (Metacam [®])	Boehringer Ingelheim, Ingelheim/Rhein, Deutschland
Natriumchlorid-Lösung (isoton)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Natriumcitrat-dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pentobarbital (Narcoren [®])	Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
Ringer-Lactat-Lösung	Delta Select GmbH, Dreieich, Deutschland
Rosiglitazon (Kaliumsalz)	Cayman Chemical Company, Michigan, USA
Rotisol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Serum (Esel)	Jackson Immuno Research, Westgrove, USA
Serum (Kaninchen, Ziege)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Serumalbumin, bovines	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Streptavidin/HRP	Jackson Immuno Research, Westgrove, USA
Streptavidin-Cy2	Jackson Immuno Research, Westgrove, USA
Terpineol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Thionin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Thymol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X100	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

5. Geräte

Gerät	Hersteller
Blutzuckermessgerät (GlucoMen [®] Lx PLUS+)	A. MENARINI diagnostics, Firenze, Italien
CCD-Schwarz-Weiß-Kameras	Conrad Electronic GmbH, Hannover, Deutschland
Datenerfassungssysteme (Power Lab/800s)	ADInstruments Ltd, Hastings, UK
Ethovision XT 8.5	Noldus, Wageningen , Niederlande
Farbkamera	Conrad Electronic GmbH, Hannover
Farbkamera, digitale (<i>single chip charge coupled device</i> , CCD, CX9000)	Microbrightfield Europe, Magdeburg, Deutschland
Festplatte, externe	Conrad Electronics SE, Hirschau, Deutschland
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Halogen-Kaltlichtreflektoren (50 Watt, 230 Volt)	Karat, Kleve, Deutschland
Kamera (CCTV Camera, Modell-Nr. WV-BP330/OE)	Panasonic System Solutiones Suzhou Co. Ltd., Suzhou, China
Kühlvorrichtung (Frigomobil)	Fa. Reichert-Jung, Wetzlar, Deutschland
LabChart7	ADInstruments Ltd, Hastings, UK
Lampen (60 Watt, 240 Volt)	Osram Concentra, Frankreich
Lampen (80 Watt)	Philips Lighting, Eindhoven, Niederlande

Luxmeter (Lightmeter MS-1300, Voltcraft®)	Conrad Electronic SE, Hirschau, Deutschland
Makrolonkäfige Typ III	EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH und Co.KG, Emmendingen, Deutschland
Mikroskop (Leica DM LB-Mikroskop)	Leica, Bensheim, Deutschland
Mikroskop, konfokales (LSM 510)	Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Deutschland
Plan-Neoflunar Linse	Leica, Bensheim, Deutschland
Schlittenmikrotom (Modell 1205)	Fa. Reichert-Jung, Wetzlar, Deutschland
Schrauben aus rostfreiem Edelstahl	Schrauben-Preisinger GmbH, München, Deutschland
Signalverstärker	Animal Bio Amp, ADInstruments Ltd, Hastings, UK
StereoInvestigator 6.0	Microbrightfield Europe, Magdeburg, Deutschland
Stereotakt	TSE Systems GmbH, Homburg, Deutschland
Stimulationsapparatur (Accupulser Modell A310C und Stimulus Isolator Modell A310C)	World Precision Instruments, Berlin, Deutschland
Stimulatorereinheit (Stimulator I Type 215E/1)	Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland
Teststreifen für Blutzuckermessgerät (GlucoMen®Lx sensor)	A. MENARINI diagnostics, Firenze, Italien
Tubes (Multi®-SafeSeal®Tubes)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Zentrifuge (Centrifuge 5804R)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
-------------------------------	---

XI. DANKSAGUNG

Zu Allererst möchte ich Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka für die Bereitstellung des spannenden Themas, der kompetenten Anleitung zur pharmakologischen und neurowissenschaftlichen Forschung sowie der guten Betreuung danken. Des Weiteren danke ich Ihnen für die herzliche Aufnahme in Ihrer Arbeitsgruppe, Ihrer stetigen Hilfsbereitschaft und für die Unterstützung meines beruflichen Werdegangs.

Ein ganz besonderer Dank gilt Vera Rußmann für die wundervolle Betreuung, der stetigen Unterstützung meiner Arbeit, die unermüdliche Motivation sowie die interessanten wissenschaftlichen Diskussionen. Vielen Dank für die schöne gemeinsame Zeit, die zahlreichen gemeinsamen Auto- und U-Bahnfahrten, die vielen Gespräche und die aus dieser Zeit entstandene Freundschaft.

Christina Zellinger möchte ich für die schöne gemeinsame Zeit am Institut und für die fachliche Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit danken. Vielen Dank dafür!

Bei Tanja Ongerth und Josephine Salvamoser bedanke ich mich für die wundervolle gemeinsame Zeit, ihre Freundschaft, die zahlreichen wissenschaftlichen aber auch privaten Gespräche und für die vielen Restaurantbesuche. Ihr habt eine wunderbare Arbeitsatmosphäre geschaffen.

Eva-Lotta von Rüden und Renée Marie Bogdanovic danke ich für die gemeinsame Zeit und Ihre fachliche Unterstützung. Auch bei Andreas Walker und Luzie Rettenbeck möchte ich mich für die schöne, gemeinsame Zeit bedanken. Viel Erfolg bei der Fertigstellung Eurer Dissertationen sowie Eurem weiteren beruflichen Werdegang.

Ein großer Dank gilt Angela Vicidomini, Marion Fisch, Barbara Kohler, Regina Rentsch, Olga Cabezas, Andreas Blaschke, Sieglinde Fischlein und Manfred Kutschka für die stets freundliche und hilfsbereite technische Unterstützung.

Sabine Vican möchte ich für die kompetente und fürsorgliche Pflege meiner Tiere danken.

Der Rechnerbetriebsgruppe danke ich für die Hilfeleistung bei technischen Problemen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für die stetige Unterstützung in allen Lebenslagen, den bedingungslosen Rückhalt sowie der finanziellen Unterstützung. Insbesondere meiner Mutter und meinem Bruder möchte ich für ihr Vertrauen und die Kraft, die sie mir insbesondere in schwierigen Zeiten gegeben haben, bedanken.

Bei Patrick möchte ich mich für den Rückhalt, den er mir sowohl während Studiums als auch der Doktorarbeit gegeben hat, bedanken. Er war in jeder Lebenslage für mich da – vielen Dank dafür.

Der DFG danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Studie (PO 681/5-2).